

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Senescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques aux UVB

Antoine, Nathalie

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**SENESCENCE INDUITE PREMATUREMENT PAR DES STRESS
SUBCYTOTOXIQUES AUX UVB**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Nathalie ANTOINE

Juin 2003

VTL 20044880

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0)81.72.44.18. – Téléfax : + 32(0)81.72.44.20.
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://www.fundp.ac.b/fundp.html>

Sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques aux UVB

ANTOINE Nathalie

Résumé

Dans ce mémoire, nous étudions la sénescence des fibroblastes diploïdes humains (FDHs) induite prématurément par des stress subcytotoxiques (SIPS) sous UVB. Le modèle de stress utilisé consiste en une exposition des FDHs de peau à une dose de 250 mJ/cm² d'UVB deux fois par jour pendant cinq jours suivi de deux jours de repos. Le but de ce travail était premièrement de confirmer si ce modèle expérimental déclenche bien la SIPS chez ces cellules et deuxièmement d'étudier l'expression génique de ces cellules en utilisant un damier à ADNc à basse densité spécifiquement développé pour ce type de modèle. Parmi les biomarqueurs de sénescence étudiés se trouvent l'activité β -galactosidase associée à la sénescence, la capacité de prolifération estimée par le niveau d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN et le niveau d'expression protéique des inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} ainsi que p53 par Western Blot et enfin l'étude du niveau relatif d'ARNm de gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence grâce à la Real Time RT-PCR.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2003

Promoteur : O. Toussaint

Arrivée au terme de ces quatre années d'études en biologie (enfin !!), je profite de ce mémoire pour remercier tous ceux qui ont contribué à sa réalisation.

Tout d'abord, je tiens à remercier madame le professeur Martine Raes de m'avoir acceptée au sein de l'URBC.

Ensuite, je veux remercier mon promoteur monsieur Olivier Toussaint pour m'avoir acceptée dans son équipe. « Votre » humour et « vos » conseils furent toujours les bienvenus.

Mes remerciements iront ensuite et surtout à ma tutrice Florence qui a dû me supporter pendant ce travail. J'irais porter des roses à Sainte Rita et brûler un cièrge à Saint Aubain pour que tu ne te fasses plus de cheveux blancs.

A l'équipe des GRAS : « nous sommes fous mais nous sommes sérieux ». Je ne l'oublierai pas.

Aux membres de l'URBC pour votre accueil. Plus particulièrement à Edouard, le pro du Western Blot. Scout un jour, scout toujours ! Et oui Edouard. A Guy, si discret et si indispensable avec sa bonne humeur. Il y a aussi François qui est toujours là pour nous aider. Et n'oublions pas ce cher Marc qui ferme les yeux chaque fois qu'il me voit sur un ordi.

Je voudrais aussi remercier tous les mémorants : Delphine, Emmanuelle, « Tortue », Mélanie, Vanessa, Caroline, Cindy, Marion, Virginie, Jérémie. Et plus particulièrement Nadine pour m'avoir soutenue lors de la terrible épreuve de la page 33. Nous avons passé beaucoup de moments inoubliables.

Je remercie mes parents de m'avoir aidée et supportée pendant ces quatre années.

Nathalie

Liste des abréviations et unités

[³ H]-T	thymidine tritiée
μCi	microcurie
β-gal	β-galactosidase
°C	degré celcius
μg	microgramme
μl	microlitre
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ANX1	annexine 1
AOP-2	protéine anti-oxydante 2
apo E	apolipoprotéine E
apo J	apolipoprotéine J
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
B1-T	tampon B1 1x + Tween 0,1 %
BAT-1	ARN-hélicase nucléaire
BAX	protéine X associé à BCL2
BCL2	« B-cell lymphoma 2 »
BME	milieu basal de Eagle
BSA	albumine de sérum bovin
C	cytosine
CASP8	caspase 8
Cc°	concentration
CCN	cycline
CDC42	protéine de division du cycle cellulaire 42
CDK	kinase dépendante de cycline
CDKI	inhibiteur de kinase dépendante de cycline
cm ²	centimètre carré
COL1A1	alpha1-procollagène I
COL1A2	alpha2-procollagène I
COL3A1	alpha1-procollagène III
COL6A2	alpha2-procollagène VI
COX2	cyclooxygénase 2
CpG	cytosine-phosphate-guanine
cpm	coup par minute
CROC1A	variant 1 de l'enzyme E2 conjuguée à l'ubiquitine
Ct	« threshold cycle » ou cycle seuil
CTGF	facteur de croissance du tissu conjonctif
CTL	cellules contrôles
DCP	doublément cumulatif de population
dH ₂ O	eau distillée
DO	densité optique
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
E	efficience
EDTA	éthylène diamine tétra acétique
EF1A	« eukaryotic translation elongation factor 1 »
EGR-1	« early growth reponse 1 »

EIF4A	« eukaryotic translation initiation factor 4 »
ELN	élastine
ETFB	sous-unité β de la flavoprotéine de transfert d'électron
EtOH	éthanol
EWSR1	« Ewing sarcoma breakpoint région 1 »
FBS	sérum fœtal bovin
FDH	fibroblaste diploïde humain
Fibro	fibronectine
FMOD	fibromoduline
FN1var2	variant 2 de la fibronectine
g	gramme
G	guanine
G1	« gap 1 »
G6PD	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GAA	précurseur II de la glucosidase
GADD153	transcrit 3 inductible par les dommages à l'ADN
GAPDH	glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase
GLB-1	beta-galactosidase 1
GPX	glutathion peroxydase
Grb2	protéine 2 liée au récepteur de facteur de croissance
h	heure
H₂O₂	peroxyde d'hydrogène
H3FF	membre F de l'histone 3
hsp	« heat shock protein »
hTERT	sous-unité catalytique de la télomérase humaine
ICAM	molécule d'adhésion intracellulaire
ID-2	inhibiteur 2 de liaison à l'ADN
IGFBP	« insuline growth factor binding protein »
IL	interleukine
j0	cellules contrôles jour zéro
JNK	jun N-terminal kinase
Kb	kilo paire de bases
kDa	kilo dalton
l	litre
M	mitose
M	molaire
M.W.	marqueur de poids moléculaire
MAPK	protéine kinase activée par les mitogènes
MEC	matrice extra cellulaire
MEK	kinase activée par les mitogènes
MF	fibroblaste mitotique
mg	milligramme
min	minute
mJ	millijoule
ml	millilitre
mM	millimolaire
MMP	matrice métalloprotéinase
MOPS	acide 4-morpholinepropanesulfonique
mt	mitochondrial
MT2A	métallothionéine 2A

N	normale
ng	nanogramme
nm	nanomètre
NTC	contrôle sans matrice d'ADN
Ostéo	ostéonectine
PAK	kinase activée par p21
pb	paire de bases
PBS	tampon phosphate salin
pH	potentiel d'hydrogène
PMF	fibroblaste post-mitotique
pRb	protéine du rétinoblastome
PSMD1	protéine 1 de la sous-unité 26s du protéasome
Real Time RT-PCR	réaction en chaîne de polymérisation en temps réel suite à une rétro-transcription d'ARN total
ROS	radicaux libres dérivés de l'oxygène
RPL13A	protéine ribosomale de 23-kDa
rpm	tour par minute
RT	rétro-transcription
S	synthèse
SA β-gal	β -galactosidase associée à la sénescence
SDS	sodium dodécyl sulfate
sec	seconde
SIPS	sénescence induite prématurément par les stress
SLP-2	« stomatine like protein 2 »
SM22	protéine de muscle lisse 22
T	thréonine
T	thymine
T75	boîtes de cultures de 75 cm ²
<i>t</i>-BHP	<i>tert</i> -butylhydroperoxyde
TBS 10x	tampon salin Tris concentré 10x
TBS-T	tampon salin Tris + Tween 0,1 %
TCA	acide trichloracétique
TFAP2A	facteur de transcription AP-2 α
TGF-β1	facteur de croissance tissulaire β 1
TIMP	inhibiteur tissulaire de matrice métalloprotéinase
Tm	température de melting
TNFRSF	récepteur du TNF- α
TβRII	récepteur II du TGF- β 1
U	unité enzymatique
UV	ultraviolet
UVB	cellules stressées aux UVB
VEGF	facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside
Y	tyrosine

TABLE DES MATIERES

PARTIE I : INTRODUCTION	1
1) Sénescence cellulaire et SIPS	1
La sénescence répllicative	1
Le phénotype sénescant	1
Sénescence répllicative et vieillissement	2
Sénescence répllicative et pathologies liées à l'âge	2
Sénescence et Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS)	3
2) Biomarqueurs du vieillissement	4
Les morphotypes	4
L'activité β -galactosidase associée à la sénescence	5
Délétions d'ADN mitochondrial	5
Le raccourcissement des télomères	6
Régulation du cycle cellulaire	7
Le cycle cellulaire	7
Cyclines et kinases dépendantes des cyclines	7
Inhibiteurs du complexe cyclines/CDK	8
Expression de gènes associés à la sénescence	9
3) Ultraviolet et stress aux UVB	10
Les rayons ultraviolets	10
Dommages à l'ADN causés par les UV	10
Types de réactions photosensibles	10
Dommages directs induits par les UV au niveau de l'ADN	11
Dommages indirects induits par les UV au niveau de l'ADN	11
SIPS aux UVB sur des FDHs	11
4) TGF-β1 et SIPS	12
5) Analyse de la sénescence répllicative via hybridation sur damier	13
6) But du mémoire	15
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	16
1) Culture de fibroblastes de peau humaine	16
Principe	16
2) Stress subcytotoxiques aux UVB	16
Matériel	16

Méthode	16
3) Dosage de protéines par la méthode de Lowry	16
Principe	16
Matériel	16
Méthode	17
4) Biomarqueurs de la sénescence répliative	17
Détection de l'activité SA β-gal	17
Matériel	17
Méthode	17
Incorporation de thymidine tritiée	18
Matériel	18
Méthode	18
5) Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)	18
Extraction d'ARN total	19
Matériel	19
Méthode	19
Rétro – transcription d'échantillon d'ARN	19
Matériel	19
Méthode	20
Real Time RT-PCR	20
Recherche de couples d'amorces appropriés	20
Optimalisation de la concentration en amorces	20
<i>Matériel</i>	20
<i>Méthode</i>	20
Cycles de Real Time RT-PCR	21
Analyse des résultats	21
6) Western Blot	21
Matériel	21
Méthode	21
Préparation des échantillons et migration	21
Transfert des gels sur membrane	22
Lavages des membranes	22
Révélation – déshybridation des anticorps	22

7) Hybridation sur damier à ADNc à basse densité	22
Extraction d'ARNm	22
Matériel	22
Méthode	23
<i>Sous hotte</i>	23
<i>Zone RNASE-FREE</i>	23
Retro-transcription de l'ARNm	23
Matériel	23
Méthode	24
Hybridation sur damier	24
Matériel	24
Méthode	25
<i>Hybridation</i>	25
<i>Lavages</i>	25
<i>Détection</i>	25
Scan des damiers	25
Analyse des résultats	25
PARTIE III : RESULTATS	26
Etude des biomarqueurs de la sénescence	26
1) Activité β-galactosidase associée à la sénescence	26
2) Capacité de prolifération	27
a) Incorporation de [3 H]-thymidine	27
b) Etude d'inhibiteurs du cycle cellulaire	28
3) PCR en temps réel	28
4) Hybridation sur damier à ADN : SeneChips	36
Matrice extra cellulaire	36
Réponse aux stress et réparation de l'ADN.	37
Cycle cellulaire	38
Métabolisme énergétique	39
Cytokine et récepteur	40
Divers	41
DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	43
PARTIE VI : BIBLIOGRAPHIE	46

INTRODUCTION

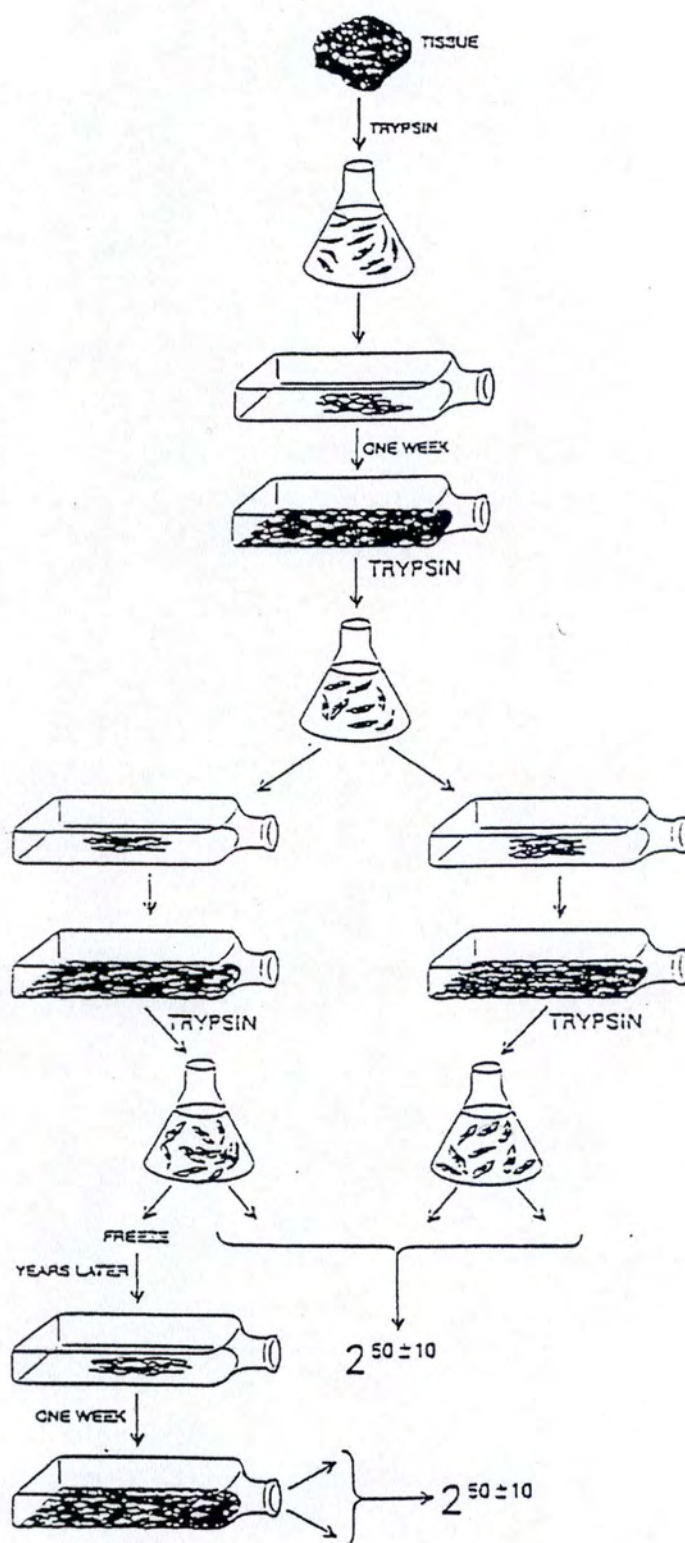


Figure 1 : Méthode classique de culture cellulaire (Hayflick and Moorhead, 1961).

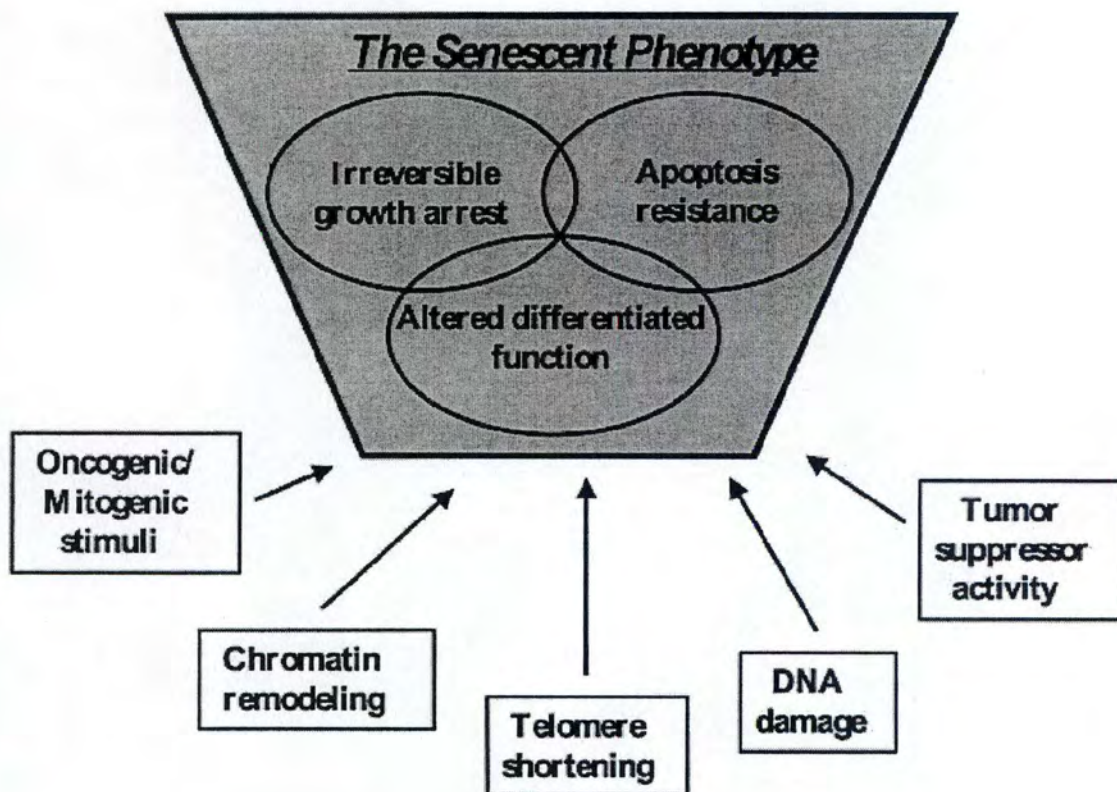


Figure 2 : *Le phénotype sénescence* (Itahana et al., 2001).

PARTIE I : INTRODUCTION

1) Sénescence cellulaire et SIPS

La sénescence répllicative

Hayflick et Moorhead ont montré *in vitro*, par leur méthode de culture (Figure 1), que les fibroblastes diploïdes humains (FDHs) avaient un potentiel limité de divisions cellulaires (Hayflick and Moorhead, 1961). Ceci se constate également dans beaucoup d'autres types cellulaires eucaryotiques dotés de capacité de prolifération. Le potentiel de prolifération limité est la caractéristique principale qui définit la sénescence répllicative.

Outre l'arrêt de la division cellulaire, diverses autres caractéristiques ont été établies. Parmi celles-ci, on retrouve un changement de morphologie cellulaire (établissement des morphotypes (Bayreuther et al., 1988)), une activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) (Dimri et al., 1995), une fréquence accrue de la délétion commune de 4 977 pb de l'ADN mitochondrial (Meissner et al., 2001), un raccourcissement des télomères (Harley et al., 1990) et des changements typiques du niveau d'expression de nombreux gènes (Cristofalo et al., 1998a).

Le phénotype sénescence

Le nombre de cellules sénescence augmente exponentiellement *in vitro* avec les doublements cumulatifs de populations (DCPs). Ces cellules sénescence restent viables et métaboliquement actives pour une longue période de temps.

Trois caractéristiques majeures distinguent les cellules sénescence des cellules jeunes (pour une revue (Campisi, 1999) (Figure 2).

Premièrement, les cellules sénescence sont incapables de proliférer et ce, de façon irréversible. Leur cycle cellulaire s'arrête avant la phase de synthèse de l'ADN (phase S) c'est-à-dire en phase de repos G1. Les mitogènes physiologiques ne peuvent plus stimuler l'entrée de ces cellules sénescence en phase S du cycle cellulaire. Toutefois, au moins trois proto-oncogènes (c-Jun, c-Myc, c-Ras-Ha), restent inductibles par les mitogènes dans les fibroblastes humains sénescence ce qui montre que cet arrêt de prolifération n'est pas dû à un arrêt général de la transduction du signal de ces facteurs de croissance.

Deuxièmement, les cellules sénescence sont résistantes à l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Le mécanisme par lequel les cellules sénescence résistent à la mort apoptotique n'est pas encore très bien compris. Cependant, la résistance à l'apoptose pourrait expliquer pourquoi les cellules sénescence s'accumulent *in vivo*.

Troisièmement, les cellules sénescents montrent des changements au niveau de leur métabolisme cellulaire. Parmi ces changements, citons un agrandissement de la taille des cellules, une augmentation de la biogenèse des lysosomes, une diminution des taux globaux de synthèse et de dégradation des protéines. De plus, il y a des changements dans la régulation du niveau d'expression de gènes spécifiques aux types cellulaires. Par exemple, les FDHs sénescents surexpriment des métalloprotéinases dégradant les protéines de la matrice extracellulaire comme la collagénase et la stromélysine (MMP-1 et MMP-3) tandis que l'expression d'inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMP-1 et TIMP-3) est diminuée. La sénescence répliquative peut donc occasionner des changements dans l'état de différenciation, ce qui peut avoir des conséquences pour la fonction et l'intégrité de la cellule et pour le tissu.

La sénescence répliquative résulte donc en un phénotype complexe, qui occasionne beaucoup plus qu'un simple arrêt définitif de la prolifération cellulaire.

Sénescence répliquative et vieillissement

Existe-t-il un lien entre la sénescence répliquative et le vieillissement de l'organisme ?

D'une part, les cultures de cellules issues de donneurs jeunes réalisent plus de passages en culture que les cultures de cellules issues de donneurs âgés. C'est-à-dire que le nombre de DCPs diminue en fonction de l'âge des donneurs. Ainsi, les FDHs issus de jeunes donneurs peuvent effectuer *in vitro* de 20 à 50 DCPs tandis que les FDHs issus de donneurs âgés ne peuvent effectuer que 10 à 30 DCPs (pour une revue (Campisi, 1999)).

D'autre part, on observe que des cellules provenant d'espèces à durée de vie courte « vieillissent » plus vite que des cellules provenant d'espèces ayant une durée de vie plus longue. Bien que d'autres interprétations soient possibles, ces résultats montrent la possibilité que les gènes qui contrôlent la durée de vie chronologique de l'organisme puissent également être impliqués dans le contrôle de la durée de vie répliquative des cellules.

De plus, les cellules d'individus ayant des syndromes héréditaires de vieillissement prématuré atteignent plus rapidement l'état de sénescence que les cellules d'individus sains.

Finalement, des modifications similaires dans la régulation de quelques gènes sont observées dans la sénescence répliquative en culture et lors du vieillissement *in vivo*. Par exemple, le proto-oncogène c-fos n'est plus inductible par des agents mitogènes dans les FDHs sénescents.

Sénescence répliquative et pathologies liées à l'âge

On a proposé que les cellules sénescents s'accumulent *in vivo* avec l'âge (Krtolica and Campisi, 2002). Cette accumulation peut être due à de nombreux facteurs. Parmi ces facteurs, on inclut : le raccourcissement des télomères, les dommages à l'ADN par une source endogène (oxydation mitochondriale) ou exogène (radiation ionisante), la perte d'hétérochromatine, et l'activation inappropriée de mécanismes mitogéniques.

La présence de cellules sénescences dans un tissu pourrait contribuer à l'apparition de pathologies liées à l'âge. En effet, on a remarqué que dans beaucoup de cas où des cellules issues de sites de pathologies sont cultivées *ex vivo* la durée de vie répliquative de ces cellules est réduite et il y a une augmentation dans la proportion de cellules positives pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence par rapport aux cellules de cultures provenant de tissus sains.

Des cellules présentant des biomarqueurs de la sénescence ont été mises en évidence dans des pathologies comme les ulcères veineux, les lésions hyperplasiques de la prostate, les lésions athérosclérotiques de l'aorte ainsi que dans l'hépatite chronique et dans le tissu entourant le carcinome du foie.

Sénescence et Sénescence Induite Prématurément par les Stress (SIPS)

De nombreux modèles expérimentaux de SIPS ont démontré que des stress oxydatifs induisaient la sénescence répliquative (Toussaint et al., 2000).

Deux types de protocoles de SIPS induit par des stress oxydatifs ont été développés.

Le premier type est un modèle de SIPS utilisant des stress chroniques sur différentes cultures de cellules humaines comme les FDHs, les kératinocytes, les cellules endothéliales de vaisseaux ombilicaux ou les mélanocytes. Ce type de SIPS consiste, par exemple, en une exposition à un état d'hyperoxie en augmentant la pression en oxygène au-dessus du seuil normal.

Le deuxième type est un modèle de SIPS utilisant des stress ponctuels répétés ou non, utilisant les FDHs ou les mélanocytes. Ces stress peuvent être causés par différents agents tels qu'une atmosphère hyperbarique ayant 50% en O₂, le *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP), la mitomycine C, les radiations ultraviolets (UV), l'éthanol (EtOH) ou le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Notre laboratoire s'est surtout intéressé aux FDHs de poumon sur lesquels ont été effectués des stress au *t*-BHP (Dumont et al., 2000b) à l'EtOH (Dierick et al., 2002b), et à l'H₂O₂ (Fripiat et al., 2002) ainsi qu'aux FDHs de peau exposés aux UVB (Chainiaux et al., 2002a).

En réponse aux stress, les FDHs développent une morphologie sénescence et on constate une augmentation de la proportion en morphotypes postmitotiques. Plusieurs autres caractéristiques de la sénescence répliquative ont été observées : arrêt de la prolifération des cellules dû à la surexpression d'inhibiteurs de kinase dépendante de cycline (CDKI) comme p21^{WAF-1}, raccourcissement des télomères, apparition de l'activité SA β -gal, délétion commune de 4 977 pb de l'ADN mitochondrial, etc. Des changements dans le niveau d'expression d'un nombre limité de gènes mis en évidence chez les FDHs en sénescence répliquative ont également été observés à long terme après ces stress subcytotoxiques.

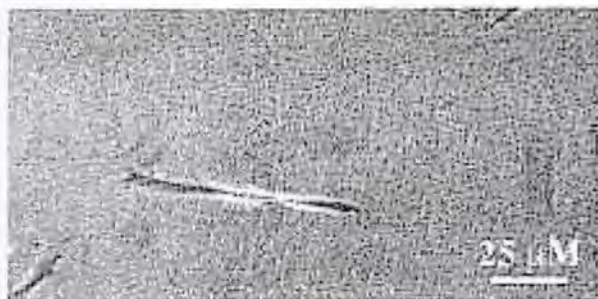
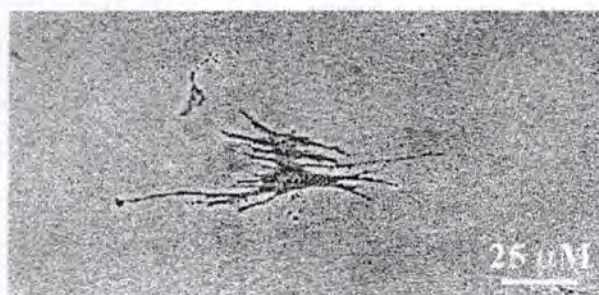
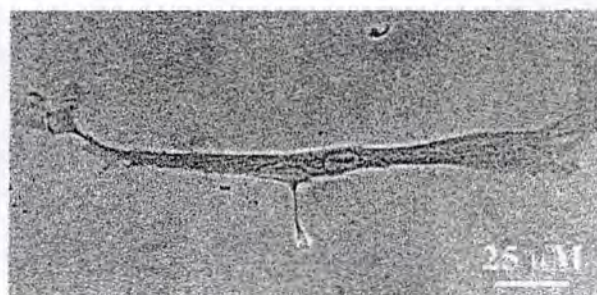
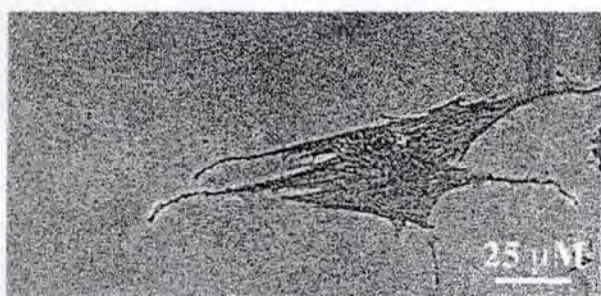
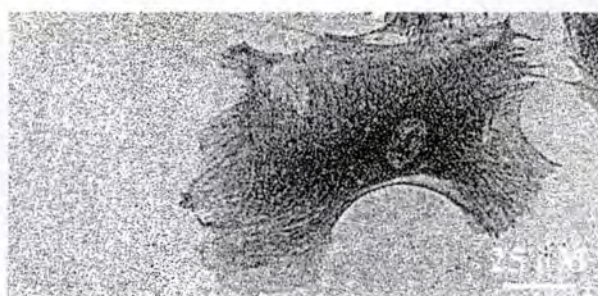
MF I**MF II****MF III****PMF IV****PMF V****PMF VI**

Figure 3 : Représentation des différents morphotypes observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur durée de vie à travers une séquence de 7 morphotypes. Les trois premiers sont des morphotypes mitotiques (MF I, MF II, MF III) et les 4 suivants sont des morphotypes post-mitotiques (PMF IV, PMF V, PMF VI, PMF VII). Le morphotype PMF VII représente les cellules nécrotiques, il est rarement observé en culture (Toussaint et al., 1992).

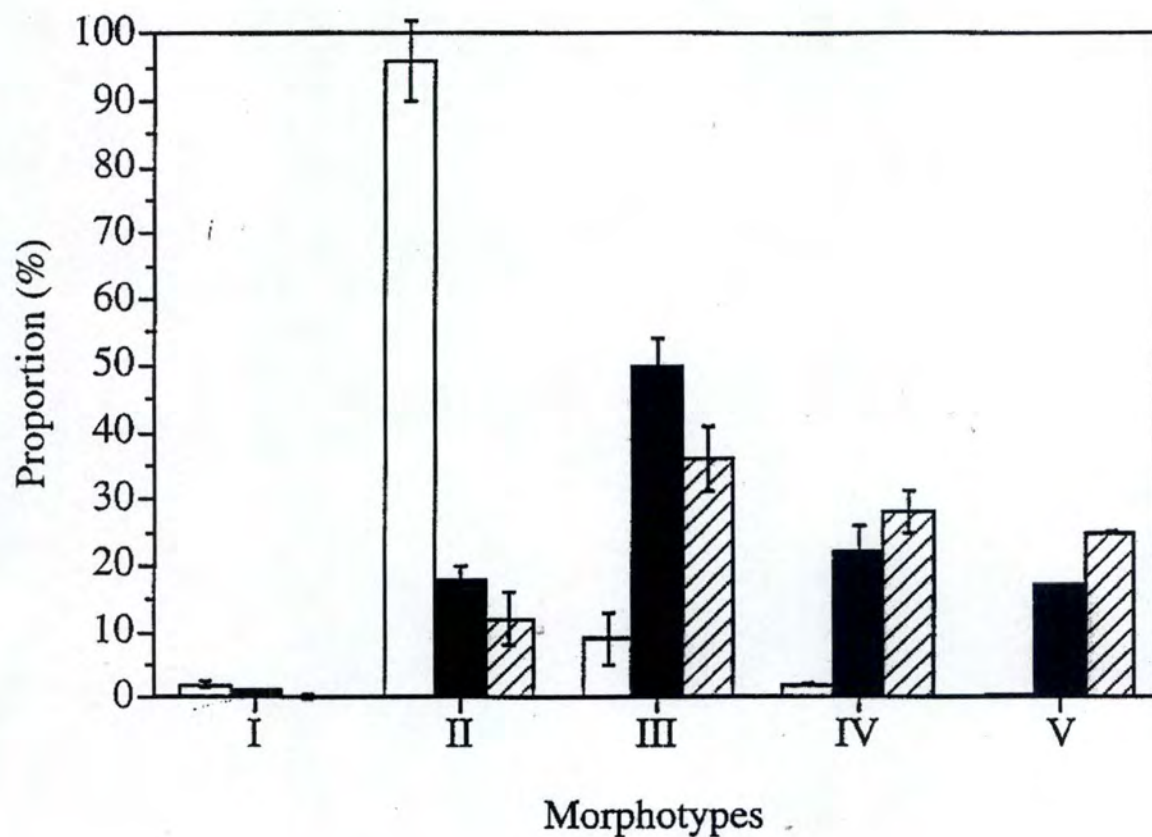


Figure 4 : La proportion des morphotypes varie en fonction des DCPs effectués par les cellules en culture et des stress subis. Fibroblastes WI-38 jeunes : DCPs 27 (colonnes blanches), fibroblastes WI-38 âgés : DCPs 43 (colonnes noires), et fibroblastes WI-38 jeunes DCPs 27 deux jours après avoir subi 5 stress successifs à 100 μ M de t-BHP (colonnes hachurées) (Toussaint et al., 1998).

Bien que les effets à long terme des stress subcytotoxiques fassent apparaître des biomarqueurs de la sénescence répllicative, le phénotype des cellules en SIPS n'est pas totalement identique au phénotype des cellules en sénescence répllicative.

Une étude du protéome par les techniques de gels à deux dimensions et de spectrométrie de masse (Dierick et al., 2002a) a identifié des protéines dont les niveaux d'expression variaient chez les FDHs en sénescence répllicative et en SIPS induite par le *t*-BHP ou l'EtOH.

Plusieurs différences d'expression ont été mises en évidence dans les FDHs en SIPS.

Tout d'abord, plusieurs protéines sont exprimées au même niveau en sénescence répllicative et en SIPS.

Ensuite, certaines protéines subissent des changements de niveaux d'expression spécifique de chaque condition de stress.

Enfin, d'autres protéines ont un niveau d'expression modifié en SIPS, indépendamment de la nature du stress appliqué.

Ces deux derniers types de changements d'expression de protéines ont été définis comme étant les cicatrices moléculaires des stress subcytotoxiques (Brack et al., 2000).

2) Biomarqueurs du vieillissement

Les morphotypes

Tout au long des doublements cumulatifs de populations, représentant le vieillissement cellulaire *in vitro*, les FDHs subissent des changements morphologiques (Bayreuther et al., 1988). Ces changements ont été classés en sept morphotypes différents (Figure 3) répartis en trois classes :

Premièrement, les morphotypes mitotiques I, II et III observés surtout dans les populations de cellules jeunes présentent une morphologie fine et une taille élancée ainsi qu'une bonne capacité de prolifération.

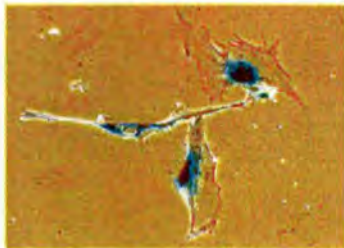
Deuxièmement, les morphotypes post-mitotiques IV, V et VI ; où les cellules présentent un élargissement de leur taille et un arrêt de la capacité de prolifération.

Troisièmement, le morphotype VII ou dégénératif. Ce dernier morphotype rare présente les cellules sénescents en état dégénératif.

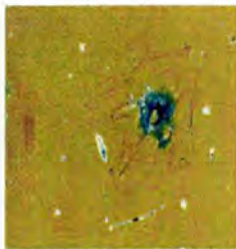
On remarque une proportion plus marquée en morphotypes post-mitotiques chez les fibroblastes en SIPS induite après stress subcytotoxique sous UVB, *t*-BHP, H₂O₂, EtOH, mitomycine C, etc. (Toussaint et al., 2000) (Figure 4).



Fibroblastes jeunes : aucune activité SA β -gal n'est détectée.



Fibroblastes sénescents : la sénescence répliquative chez les FDHs apparaît après plusieurs mois de culture. Une activité SA β -gal est alors détectée.



Fibroblaste jeune ayant subi une SIPS : la SIPS apparaît après plusieurs semaines (sous hyperoxie : 40% en oxygène), ou plusieurs jours (lorsqu'elle est induite par des doses subcytotoxiques de H_2O_2 , *t*-BHP, mitomycine C, UV, ou EtOH). Une activité SA β -gal est également détectée.

Figure 5 : Activité SA β -gal. Cette activité enzymatique est observée chez les fibroblastes diploïdes humains en sénescence répliquative et chez les fibroblastes diploïdes humains en sénescence induite prématurément par les stress (SIPS) (Toussaint et al., 2000).

L'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Une activité β -galactosidase lysosomale existe chez toutes les cellules. On la détecte par histochimie à pH 4. Une activité β -galactosidase est également détectée chez les cellules sénescents à pH 6-7 (Figure 5). Cette activité β -gal propre aux cellules sénescents est appelée l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (SA β -gal) (Dimri et al., 1995).

Kurz et al. (Kurz et al., 2000) ont montré que l'activité SA β -gal et la β -gal lysosomale ne peuvent pas être dissociées. Cette étude explique que la détection de la SA β -gal est due à une augmentation de l'expression de l'enzyme lysosomale. Elle démontre également que l'augmentation de la SA β -gal peut être entièrement expliquée par une augmentation équivalente de la masse lysosomale, confirmant que l'origine de la SA β -gal est le lysosome.

Délétions d'ADN mitochondrial

Les mitochondries possèdent leur propre matériel génétique permettant de fabriquer leur propre ARN et leurs protéines. Cet ADN code pour un petit nombre de polypeptides mitochondriaux qui s'intègrent à la membrane mitochondriale interne avec des polypeptides codés par des gènes de l'ADN nucléaire (pour un livre de référence (Karp, 1998)).

Lors de la respiration mitochondriale, des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ou ROS) sont générés par la phosphorylation oxydative et causent des altérations au niveau du génome mitochondrial. Les altérations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) comprennent des dommages oxydatifs aux bases de l'ADN, des mutations, des lésions comme la 8-oxoguanine et la thymine glycol, des duplications et des délétions. Parmi ces dernières, une délétion dite « commune » de 4977 pb de l'ADNmt est associée à la sénescence (Meissner et al., 2001).

Le taux de dommages à l'ADNmt causé par ces ROS dépend des stress oxydatifs subis ainsi que des mécanismes de défense et de réparation de l'ADNmt. On sait que la fréquence des dommages à l'ADN augmente avec l'âge dans le génome mitochondrial menant à un dysfonctionnement du métabolisme pouvant donner la mort cellulaire si ce processus se généralise dans toutes les mitochondries de la cellule (Meissner et al., 2001).

Bohr (Bohr et al., 2002) a montré que le potentiel de réparation de l'ADNmt ne diminuait pas avec l'âge mais qu'il augmentait. Néanmoins, le taux de formation de dommages dépasserait cette capacité de réparation de l'ADNmt, ce qui conduirait à une accumulation de lésions dans le génome mitochondrial.

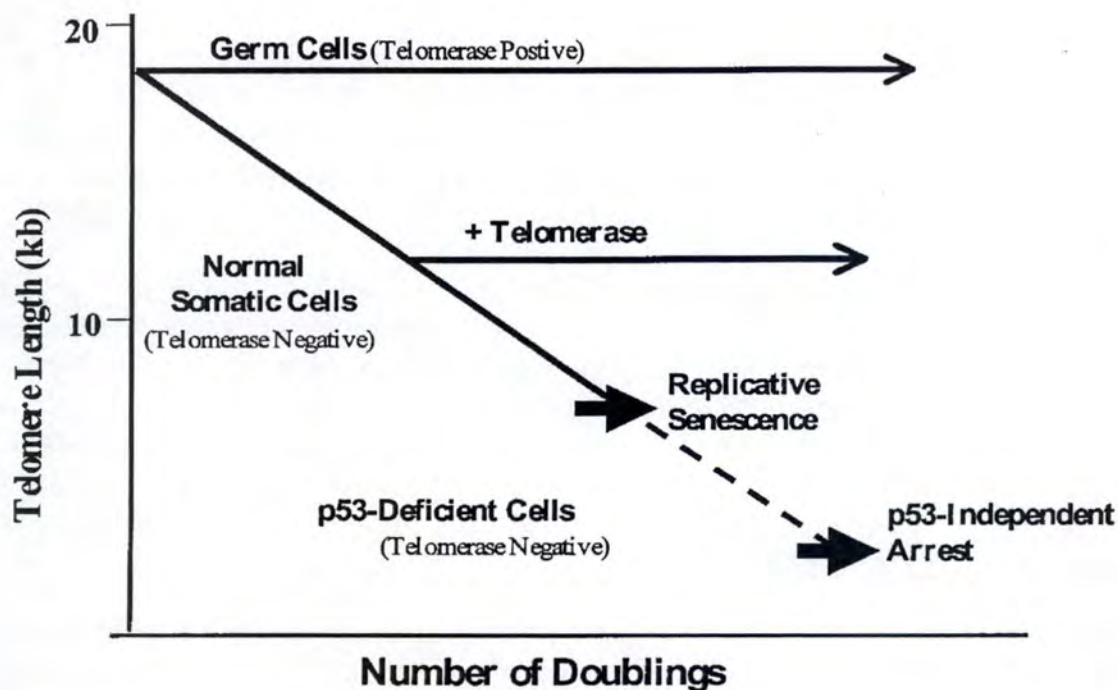


Figure 6 : Diminution de la longueur des télomères en fonction des doublements de population cellulaire (Itahana et al., 2001).

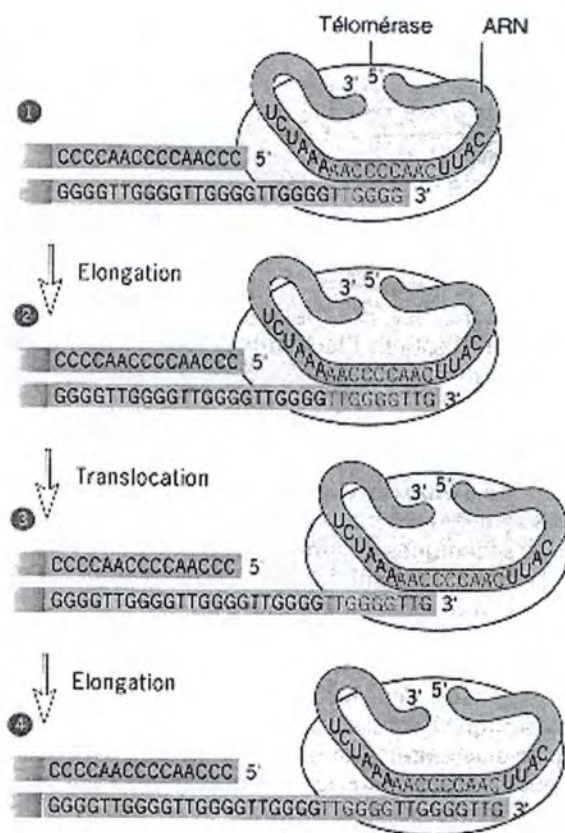


Figure 7 : Mécanisme d'action de la télomérase (pour un livre de référence (Karp, 1998)).

Le raccourcissement des télomères

Les télomères sont des complexes spécifiques composés d'ADN et de protéines fournissant une structure protectrice aux extrémités physiques des chromosomes linéaires eucaryotiques. Chez les mammifères, l'ADN télomérique consiste en une répétition d'une séquence de bases (5'-TTAGGG-3')_n à l'extrémité des chromosomes. Cette région terminale n'est pas comprise dans les nucléosomes, mais de nombreuses protéines s'y lient spécifiquement. Ces protéines forment une cape télomérique multiprotéique nécessaire à la fonction des télomères. Les télomères ont comme rôle de prévenir les processus de dégradation de l'ADN et de stabiliser la structure des chromosomes (Rhodes et al., 2002).

L'hypothèse que les télomères sont des réplisomères pouvant déclencher la sénescence répllicative est soutenue par trois observations importantes.

Premièrement, les télomères raccourcissent à chaque division des cultures de cellules humaines et ce raccourcissement est concomitant à l'arrêt de division des cellules (Figure 6). Ce raccourcissement télomérique serait dû au mode d'action des ADN polymérases incapables de répliquer complètement l'extrémité des chromosomes à chaque duplication de l'ADN.

Deuxièmement, les cellules immortelles, les cellules germinales et les cellules tumorales expriment une enzyme appelée la télomérase qui maintient la longueur des télomères.

Troisièmement, les FDHs qui montrent un raccourcissement des télomères et un phénotype de sénescence peuvent être immortalisés par la transfection de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) (von Zglinicki, 2001).

En effet, une élongation des extrémités télomériques des chromosomes peut être effectuée par cette enzyme. La télomérase est une enzyme ribonucléoprotéine constituée d'une sous-unité enzymatique de transcriptase inverse et d'une sous-unité d'ARN intrinsèque. Cet ARN est long de 445 nucléotides et composé entre autres d'une séquence répétée de 11 nucléotides (5'-CUAACCCUAA-3') anti-complémentaires de la séquence répétée des télomères (5'-TTAGGG-3')_n (Bryan and Cech, 1999).

La télomérase interagit avec l'extrémité d'ADN télomérique simple brin 3' riche en GT. Une fois que l'enzyme est liée au télomère, elle utilise sa sous-unité d'ARN comme matrice pour se guider sur le chromosome. Elle peut alors polymériser les brins télomériques en transcrivant la séquence de nucléotides d'ADN complémentaire à la matrice d'ARN. Quand la répétition télomérique complète 5'-TTAGGG-3' est formée, il y a translocation de la télomérase afin de recommencer le processus (Liu, 1999) (Figure 7).

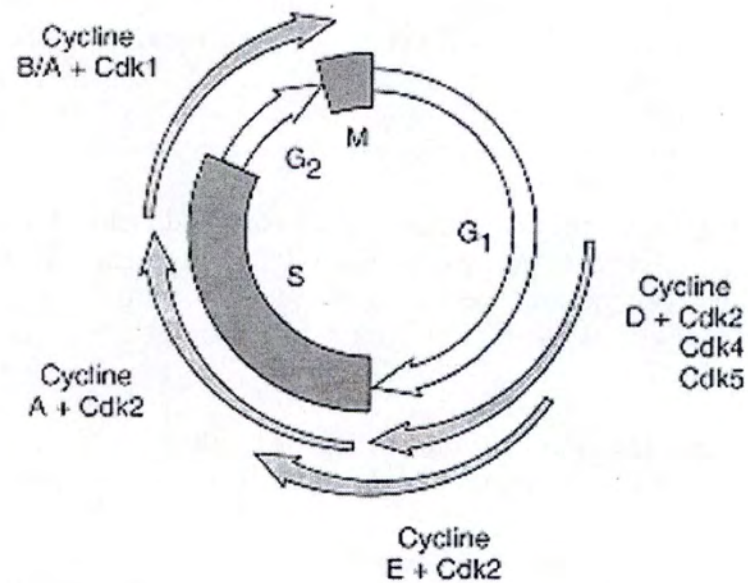


Figure 8 : Les cyclines et kinases dépendantes de cyclines agissent à différents stades du cycle cellulaire (pour un livre de référence (Karp, 1998)).

Lors de la SIPS, on remarque également un raccourcissement des télomères. En effet, chez des FDHs WI-38 exposé à 40 % O₂ on a observé un raccourcissement des télomères de 500 pb par DCP alors que les cellules contrôles en normoxie ne présentent qu'un raccourcissement de 90 pb par DCP. Les cellules stressées et les cellules contrôles subissent un arrêt irréversible de la croissance cellulaire lorsqu'elles atteignent la longueur télomérique critique de 5 Kb.

Dans une autre expérience, des stress au *t*-BHP répétés tous les deux DCPs sont effectués sur les FDHs WI-38. Là encore, on remarque un raccourcissement des télomères dû à la SIPS : perte de 245 pb/DCP au niveau des cellules stressées pour 107 pb/DCP au niveau des cellules contrôles. Dans cette étude, la longueur critique des télomères induisant un arrêt irréversible de la croissance cellulaire se situe entre 4,8 et 5,0 Kb (pour une revue (Toussaint et al., 2002)). Notons tout de même que la SIPS induite par H₂O₂ n'est pas caractérisée par un raccourcissement critique des télomères, seules quelques centaines de paires de bases sont perdues (de Magalhaes et al., 2002).

Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire

Les événements clés du cycle cellulaire sont les phases de synthèse d'ADN (S) et de mitose (M). Ces phases sont séparées par des étapes intermédiaires (« gap » en anglais), nommées G1 et G2. Les cellules qui ne se divisent pas, cellules quiescentes, sont dans un état appelé G0 qui se situe avant la phase de repos G1 (pour un livre de référence (Alberts et al., 2002)).

Cyclines et kinases dépendantes des cyclines

Toutes les phases du cycle sont régulées par des kinases dépendantes de cyclines (CDK) associées à différentes cyclines (Figure 8). Tous les membres de la famille des CDKs sont composés de deux sous-unités : une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice. Cette deuxième sous-unité porte le nom de cycline parce que leur niveau oscille au cours du cycle cellulaire. La quantité de cycline doit dépasser un certain seuil pour que la kinase soit active. De plus, il existe plusieurs couples de CDKs/cyclines ainsi que plusieurs inhibiteurs de chaque CDKs.

La transition G1/S, appelée point de restriction, est régulée par deux CDKs: CDK4/cycline D et CDK2/cycline E. Dans les cellules quiescentes, le niveau de la cycline D est bas, mais lorsque la division est induite par des facteurs de croissance, son niveau monte et CDK4 est activée. Le niveau de cycline D reste élevé tant que le facteur de croissance est présent. Le niveau de cycline E monte progressivement pendant la phase G1, alors que la cellule accumule les matériaux nécessaires pour la division, jusqu'à ce que le niveau de cycline E dépasse le seuil d'activation de CDK2.

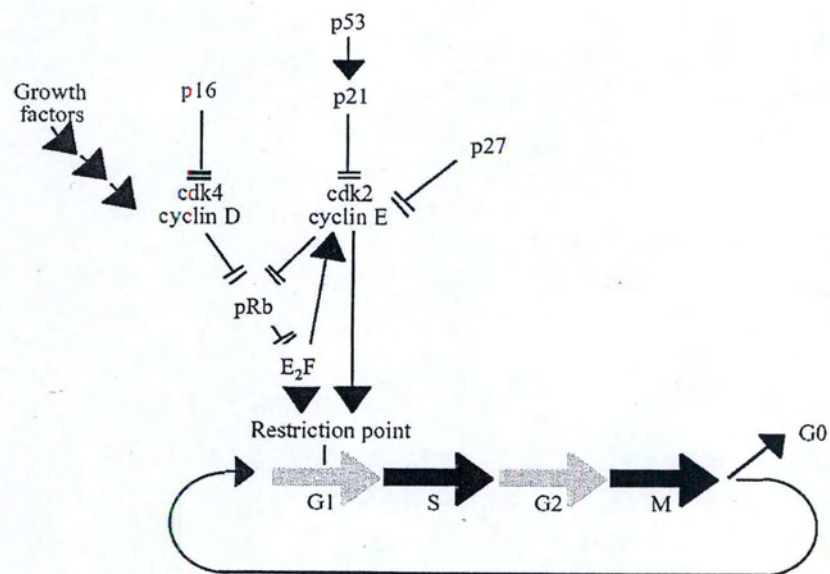


Figure 9 : Complexes cyclines/CDK régulant le cycle cellulaire (pour un livre de référence (Alberts et al., 2002)).

La protéine pRb (protéine de Rétinoblastome) est la cible de CDK4/cycline D et CDK2/cycline E. pRb est un inhibiteur du facteur de transcription E₂F, qui est responsable de la transcription de gènes codant pour des protéines requises lors la synthèse de nucléotides (par exemple, les thymidylate synthase, thymidine kinase et ribonucléotide réductase). La phosphorylation de pRb par des CDKs l'empêche de se lier à E₂F et de l'inhiber. L'événement rend définitif le passage du point de restriction.

En dehors de son rôle dans l'activation d'E₂F, CDK2/cycline E semble jouer un second rôle plus direct dans l'initiation de la réplication : elle phosphoryle les protéines liées aux origines de réplication. Après l'initiation de la réplication, les complexes CDK2/cycline E sont progressivement remplacés par CDK2/cycline A, qui continue à phosphoryler les protéines aux origines de réplication jusqu'à la fin de la phase S.

Inhibiteurs du complexe cyclines/CDK

Il y a deux familles d'inhibiteurs de cycline dépendante de kinase (CDKI) dont les membres les plus connus sont p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} (Figure 9). De plus, les CDK sont régulées par la phosphorylation : activatrice sur thréonine 161, inhibitrice sur thréonine 14 et tyrosine 15. Pour que la kinase soit active, il faut que tous les critères d'activation soient remplis : présence de cycline, absence de CDKI, phosphorylation sur T161, déphosphorylation sur T14/Y15. La CDK va ensuite phosphoryler les protéines impliquées directement dans les réactions biochimiques essentielles pour la division.

La protéine p53 joue un rôle important dans la protection des cellules contre la croissance tumorale car elle intervient dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, p53 agit en tant que suppresseur de tumeur en déclenchant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose suite à son activation en réponse à divers stimuli. Parmi ces stimuli, on retrouve : une exposition aux agents causant des dommages à l'ADN (UV, rayons gamma), l'hypoxie, le déficit en nucléotides, l'activation de gènes oncogéniques (pouvant induire l'expression du facteur de transcription E₂F qui induit à son tour l'expression du gène codant pour *ARF* se liant avec Mdm2 qui empêche alors la dégradation de p53) (Leblanc and May, 2002).

Le facteur de transcription p53 possède de multiples gènes cibles dont les gènes p21^{WAF-1} et Mdm2. p21^{WAF-1} est une CDKI qui inhibe l'activité du complexe CDK2/cycline E ainsi que de CDK4 et CDK8, bloquant ainsi la transition G1/S au point de restriction. Dans le cas où le signal activant p53 persisterait, la production de p21^{WAF-1} peut être maintenue pendant de longues périodes, conduisant à un état de sénescence cellulaire. Si le signal activant p53 disparaît, le niveau de p21^{WAF-1} tombe, et la cellule peut recommencer à se diviser. Ce processus est accéléré par une boucle de rétroaction négative comportant un autre gène cible de p53, Mdm2.

Mdm2 se lie au domaine d'activation de transcription de p53 et rend ainsi impossible la transcription des gènes cible de p53. De plus, Mdm2 induit la dégradation de p53. Dans une cellule saine, le niveau de p53 et de Mdm2 est donc faible, mais suite à l'activation de p53, le niveau des deux protéines est fortement élevé.

Expression de gènes associés à la sénescence

Des études analysant le niveau d'expression génique au cours du vieillissement ont relevé qu'un certain nombre de ces gènes montrent des changements de leur niveau d'expression. Ces observations ont été rapportées pour des cellules de cœur et de foie de rat ainsi que pour des cultures de fibroblastes humains sénescents.

On ne connaît pas encore exactement tous les mécanismes responsables de ces changements de niveau d'expression survenant lors du vieillissement cellulaire. Cependant, la méthylation de gènes, la mutation de promoteurs ou l'implication de facteurs de transcription sont plusieurs possibilités permettant d'expliquer une modification dans l'expression de ces gènes.

Par exemple, la méthylation de l'ADN est un mécanisme important par lequel le niveau d'expression d'un gène peut être régulé. Il a été démontré que la méthylation à l'extrémité 5' d'un gène, dans une région riche en îlots CpG, induit l'inhibition de l'expression de ce gène.

Les changements d'activité de facteurs de transcription fournissent également un mécanisme par lequel les niveaux d'expression des gènes peuvent être altérés. Par exemple, le facteur de transcription AP-1. AP-1 est composé de deux sous-unités protéiniques, c-fos et c-jun. Une étude a rapporté que le ratio d'ARNm c-fos/c-jun peut décliner avec l'âge dans un grand nombre de types cellulaires de mammifères. Ce déclin de l'expression du gène c-fos est confirmé par une analyse au niveau protéique via Western Blot. Ceci crée un déficit en facteur de transcription AP-1 empêchant l'activation de certains gènes (pour une revue (Goyns, 2002)).

Parmi les gènes dont le niveau d'expression augmente lors de la sénescence répllicative, citons trois gènes liés à la matrice extra cellulaire (MEC) (Gonos et al., 1998).

- La fibronectine : élément essentiel de la MEC impliqué dans l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette, la médiation de signaux mitogéniques externes, le développement, le maintien et la réparation de nombreux tissus.
- l'alpha1-procollagène I et l'ostéonectine.

Citons également le gène SM22, impliqué dans le mécanisme de transduction du signal dépendant du calcium. La concentration intracellulaire de calcium joue un rôle dans le processus de sénescence. En effet, plusieurs fonctions cellulaires comme l'expression de gènes, la synthèse d'ADN, et la mitose sont contrôlées par cette concentration en calcium qui se maintient difficilement avec l'âge. SM22 code pour une protéine se liant au calcium qui module la progression du cycle cellulaire en inhibant l'entrée de la cellule dans la phase S (Gonos et al., 1998).

Gonos et al. ont également découvert parmi les gènes surexprimés lors de la sénescence répllicative l'apolipoprotéine J (apo J) qui aurait une fonction de protection pour la survie des cellules.

Le niveau relatif d'ARNm de beaucoup de gènes change similairement dans la sénescence répllicative et dans les SIPS induites par des stress au *t*-BHP et H₂O₂. Parmi ces gènes on retrouve : la fibronectine, l'ostéonectine, l'apo J, l' α 1-procollagène I et SM22. (pour une revue (Toussaint et al., 2002))

3) Ultraviolet et stress aux UVB

Les rayons ultraviolets

Les rayons ultraviolets UVA (320-400 nm) et UVB (290-320 nm) atteignent et pénètrent la peau tandis que les UVC (190-290 nm) sont arrêtés au niveau de la couche d'ozone. Les UVA sont capables de pénétrer dans l'épiderme et d'atteindre les couches inférieures du derme. Les UVB quant à eux traversent l'épiderme et sont arrêtés au niveau des couches supérieures du derme (Tyrrell, 1995). Les cellules de peau endommagées par les UVB sont principalement les kératinocytes, les cellules de Langerhans et les fibroblastes (Fuchs and Packer, 1991).

Les rayons UV ne sont pas des radiations ionisantes mais agissent sur différents constituants cellulaires (protéines, acides nucléiques, membranes) car ils peuvent être absorbés par des molécules biologiques photosensibles comme : la mélanine, la porphyrine, et les flavines (Fuchs and Packer, 1991) (Tyrrell, 1995).

Les rayons UVA et UVB induisent des dommages oxydatifs entre autres par la formation de produits lipidiques peroxydés. En effet, les UVA sont capables de peroxyder la surface lipidique de la peau humaine. Tandis qu'une irradiation de cette surface par les UVB cause une diminution importante dans la désaturation des acides gras. Les UVB et UVC peuvent également causer des dommages à l'ADN (Fuchs and Packer, 1991).

Dommages à l'ADN causés par les UV

Types de réactions photosensibles

Les réactions photosensibles entraînant des dommages à l'ADN peuvent être classées en deux types (Fuchs and Packer, 1991) :

- La réaction de type I, les rayons UV pénétrant dans la peau sont absorbés par des molécules biologiques. Cette absorption d'énergie provoque l'excitation des électrons périphériques de la molécule biologique. Si le photon est suffisamment énergétique, un électron périphérique est arraché et il y a création d'un radical libre très réactif (Tyrrell, 1995) pouvant réagir directement avec les protéines, l'ADN, ...

- La réaction de type II, où la molécule photosensible électroniquement excitée par les UV agit avec une molécule d'oxygène se trouvant à proximité. L'oxygène qui a deux électrons périphériques aura tendance à apporter un de ses deux électrons à la molécule biologique pour remplacer son électron arraché. La molécule d'oxygène est alors transformée en un dérivé peroxyde très réactif qui peut donner naissance à d'autres radicaux libres suite à une réaction en chaîne. Les différents radicaux libres peuvent ensuite à leur tour réagir et endommager les protéines, l'ADN, ...

Dommages directs induits par les UV au niveau de l'ADN

Les dommages directs induits par les UV sont produits par l'excitation de la molécule d'ADN. Cette excitation due à un transfert d'énergie n'est possible que lorsque la longueur d'onde d'excitation est égale ou supérieure à l'énergie nécessaire pour exciter l'ADN (Fuchs and Packer, 1991).

Les UVC d'une longueur d'onde de 260 nm fournissent l'énergie nécessaire à cette excitation. Le principal photoproduit formé suite à ce transfert d'énergie est la formation de dimères pyrimidines cyclobutyl qui se font principalement entre deux thymines.

En plus des dimères de pyrimidines, les radiations UVB induisent la formation d'une liaison entre une thymine et une cytosine. Le taux de formation augmentant avec la dose d'UVB. Ces lésions sont rapidement réparées avec plus ou moins 30 % de restauration quatre heures après les dommages grâce à un mécanisme de réparation des antioxydants.

Dommages indirects induits par les UV au niveau de l'ADN

Ces dommages sont surtout créés par les intermédiaires réactifs produits lors des réactions de type II. Des transformations et des mutations de l'ADN ont été observées en présence d'oxygène montrant l'implication des ROS comme principaux intermédiaires réactifs. Les dommages à l'ADN produits par ces radicaux libres sont la thymine glycol, la thymidine glycol, la 5-hydroxymethyluracil et la 8-hydroxyguanine. De plus, les bases de guanines peuvent être inactivées par les UV dans une réaction impliquant l'oxygène singulet formant ainsi la guanidine et le trioximidazol (Fuchs and Packer, 1991).

SIPS aux UVB sur des FDHs

Chainiaux et al. (Chainiaux et al., 2002a) ont étudié les effets à long terme des UVB sur l'apparition de la SIPS sur des FDHs jeunes de peau en utilisant de faibles doses de stress mais de façon répétée (trois ou cinq stress avec 1 stress par jour). Plusieurs caractéristiques de la sénescence apparaissent dans les cellules en SIPS induites dans ces modèles.

Tout d'abord, l'activité SA β -gal est détectée dans ces cellules. Le pourcentage de cellules positives pour ce test augmente en fonction de la dose d'UVB reçue et ce pour les cellules exposées à trois ou cinq stress successifs d'UVB.

Ensuite, la capacité de prolifération dans les cellules sénescents a été analysée par l'incorporation de la thymidine tritiée ($[^3\text{H}]\text{-T}$). Plus la dose d'UVB est importante ainsi que le nombre de stress, plus la capacité d'incorporation de la $[^3\text{H}]\text{-T}$ diminue ce qui montre que la capacité de prolifération diminue également.

Enfin, le niveau relatif d'ARNm de trois gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence répliquative et après SIPS à l' H_2O_2 et au *t*-BHP a été mesurée. Ces gènes sont la fibronectine, l'ostéonectine et SM22. On observe qu'il y a une surexpression de ces gènes dans les cellules jeunes ayant subi les stress UVB par rapport aux cellules du même âge n'ayant subi aucun stress.

4) TGF- β 1 et SIPS

Frippiat et al. (Frippiat et al., 2001) ont analysé l'implication du TGF- β 1 dans l'établissement du phénotype sénescence en SIPS induite par H_2O_2 . Ils ont remarqué qu'une stimulation des FDHs IMR-90 par le TGF- β 1 induisait une morphologie sénescence, l'activité SA β -gal et une surexpression de quatre gènes associés à la sénescence (SM22, apolipoprotéine J, ostéonectine et la fibronectine).

Suite aux stress à l' H_2O_2 , ils ont remarqué que le niveau d'ARNm du TGF- β 1 augmentait après 24 heures et la quantité de protéine TGF- β 1 active dans le milieu de culture augmentait 36 heures après le stress pour disparaître ensuite 48 heures après les stress suggérant qu'un complexe de régulation prenait place.

Lors de cette étude, des FDHs IMR-90 ont été incubés avec des anticorps dirigés contre le récepteur II du TGF- β 1 (T β RII) et contre le TGF- β 1 après les stress. Ils ont observé une diminution dans la proportion de cellules positives pour l'activité SA β -gal par rapport aux cellules stressées à l' H_2O_2 en absence d'anticorps. De même, la surexpression des quatre gènes associés à la sénescence est plus basse chez les IMR-90 incubés avec ces anticorps. Ces auteurs ont aussi étudié des FDHs IMR-90 transfectés par les gènes codant pour les protéines E6 et E7 du papilloma virus 16 humain connues pour se lier respectivement à p53 et à pRb et à favoriser leur dégradation. Dans ces cellules, on ne retrouve pas l'augmentation de l'ARNm du TGF- β 1 dans ces conditions de stress montrant que p53 et pRb régulent la surexpression du TGF- β 1 après le stress sous H_2O_2 . De plus, E7 inhibe la surexpression des quatre gènes associés à la sénescence (SM22, apolipoprotéine J, ostéonectine, fibronectine) renforçant l'idée que pRb contrôle l'expression de ces gènes à travers la régulation de l'expression du TGF- β 1 (Frippiat et al., 2001).

Schéma d'hybridation

Fibroblastes jeunes

Fibroblastes jeunes soumis aux UVB

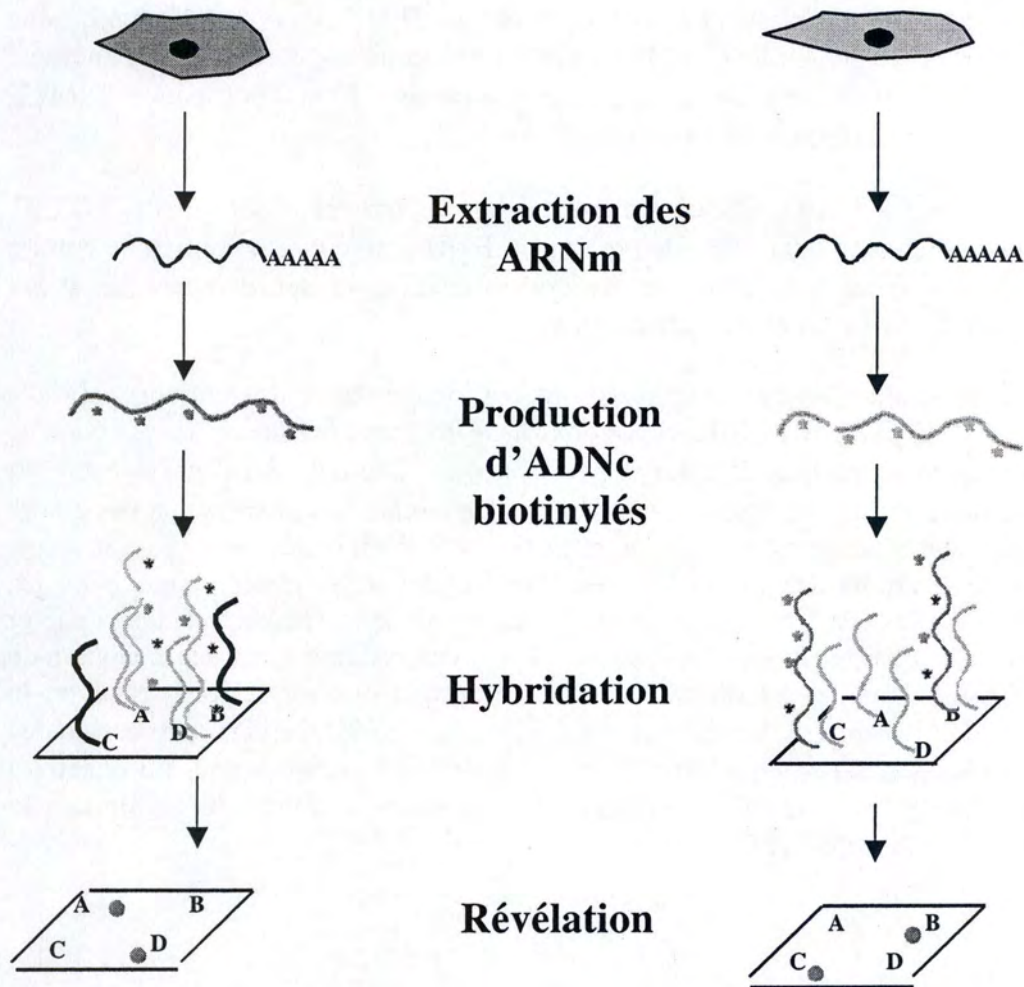


Figure 10 : Hybridation sur damier à basse densité à ADNc.

Enfin, ce groupe, a aussi constaté que lors de l'établissement du phénotype sénescence en SIPS induite par l' H_2O_2 la protéine p38 est phosphorylée et cette activation déclenche la surexpression de TGF- β 1 via l'activation d'ATF2. De plus, la sécrétion du TGF- β 1 et l'activation du récepteur II du TGF- β 1 maintiennent la phosphorylation de la protéine p38 appartenant à la famille des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et du facteur de transcription ATF2 qui restent donc activés. À 24 heures après les stress, ATF2 activé interagit avec pRb qui commence alors à être totalement hypophosphorylé. Cette activation mène à l'apparition des biomarqueurs du vieillissement comme la morphologie sénescence, l'activité SA β -gal et une surexpression de quatre gènes associés à la sénescence (SM22, apolipoprotéine J, ostéonectine, fibronectine). ATF2 et p38 phosphorylés jouent également un rôle dans l'arrêt immédiat de la croissance cellulaire (Frippiat et al., 2002).

5) Analyse de la sénescence répliquative via hybridation sur damier

Plusieurs techniques ont été établies permettant d'observer des changements dans l'expression de gènes, par exemple : le Northern Blot et la RT-PCR semi-quantitative. Mais ces méthodes ont les désavantages de n'étudier qu'un nombre restreint de gènes et d'être difficilement automatisables. Récemment de nouvelles techniques ont été mises au point, comme l'hybridation sur des damiers d'ADNc ou d'oligonucléotides, donnant la possibilité d'analyser les niveaux d'expression d'un grand nombre de gènes simultanément (Figure 10).

Les damiers sont classés en deux catégories : les damiers à haute densité (plus de 400 spots/cm²) et les damiers à basse densité (moins de 400 spots/cm²).

Les damiers à haute densité sont constitués d'oligonucléotides synthétisés à partir de séquences de référence. Lors de la rétro-transcription de l'ARNm, on ajoute un nucléotide couplé à un fluorochrome qui s'incorpore dans l'ADN ce qui permettra sa visualisation. Ce damier permet d'étudier la modulation d'expression de milliers de gènes.

Les damiers à basse densité quant à eux consistent en de nombreuses sondes d'ADN simple brin attachées par une liaison covalente sur le support en verre. La longueur de la sonde est optimisée et est identique pour tous les gènes. Ces lames sont alors hybridées avec l'ADNc biotinylé préparé à partir de l'ARNm extrait des différents échantillons. La révélation se fait grâce à un anticorps anti-biotine couplé à un fluorochrome (de Longueville et al., 2002).

Shelton et al (Shelton et al., 1999) ont utilisé des damiers à oligonucléotides à haute densité pour étudier le niveau d'expression des gènes associés à la sénescence dans différents types cellulaires - fibroblastes de peau (BJ), cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (RPE) et cellules endothéliales (HUVECs).

Au niveau des fibroblastes BJ sénescents, ils observent de hauts niveaux d'expression de gènes codant pour des protéines dégradant la MEC comme la stromélysine 1 et la 2, ainsi que pour des inhibiteurs de l'activation du plasminogène PAI-1 et PAI-2. Des gènes associés à l'inflammation (interleukine-15 IL-15 et IL-1b) présentent également de hauts taux d'expression (Shelton et al., 1999).

SeneChips (900 spots):

300 spots par damier hybridés en triplicat :

- 240 gènes (blanc)
- 60 contrôles (grisé) : - Contrôle positif et négatif d'hybridation
- Contrôle négatif de détection
- Gènes de référence
- Standard interne
- Courbe de concentration

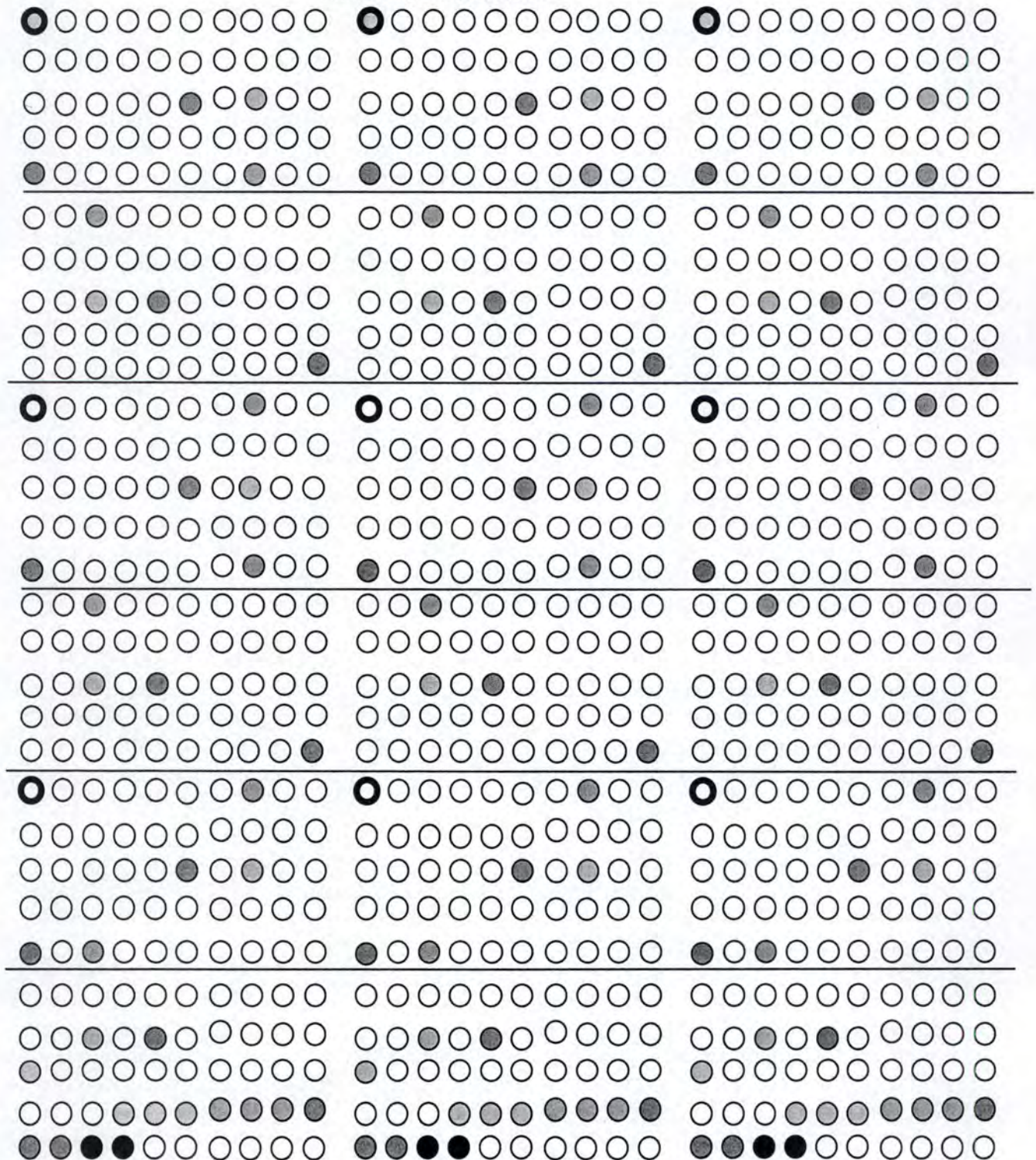


Figure 11 : Composition du damier à ADN de basse densité utilisé dans ce travail.

Dans ce travail, nous allons utiliser un damier à ADNc à basse densité : la SeneChips. Ce damier est constitué de 300 spots hybridés en triple, chaque spot étant constitué de sondes d'ADNc pour un gène particulier. Les 240 gènes représentés sur le damier ont été choisis en fonction de leur rôle dans la sénescence répliative. En plus des 240 ADNc, on retrouve également 60 contrôles (des contrôles positifs et négatifs d'hybridation, des contrôles négatifs de détection, des contrôles permettant de faire une courbe de concentration, des gènes de référence et des standards internes). Le design de la SeneChips est représenté à la figure 11.

Parmi ces 240 ADNc, nous retrouvons entre autres l'ADN codant pour:

- des gènes liés à l'adhésion cellulaire (fibronectine, ICAM-1, IL-2, IL- 8, etc.)
- des gènes liés à l'apoptose (BAX, BCL2, BCLX, Caspase 7, Caspase 8, etc.)
- des gènes liés au cycle cellulaire et à sa régulation (CDK2, cycline A1, cycline B1, etc.)
- des gènes liés aux réponses aux stress (JNK1, JNK2, apolipoprotéine J, etc.)
- des proto-oncogènes (c-fos, c-myc, etc.)
- des gènes liés au système de défense (hsp 27, hsp 70, etc.)

Modèle expérimental de stress aux UVB

Stress UVB de 250 mJ/cm²

	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6-7
Matin	Stress 1	Stress 3	Stress 5	Stress 7	Stress 9	REPOS
Soir	Stress 2	Stress 4	Stress 6	Stress 8	Stress 10	REPOS

J0 → cellules avant les stress aux UVB.

CTL → cellules contrôles non soumises aux UVB.

UVB → cellules stressées soumises aux 10 stress aux UVB.

Figure 12 : *Modèle expérimental étudié lors de ce travail.*

6) But du mémoire

L'apparition d'une sénescence induite prématurément par les stress ou « SIPS » sur des FDHs peut être induite par une exposition à divers types de stress comme le *t*-BHP, l'éthanol, H₂O₂ ou les UVB à doses subcytotoxiques.

Un modèle de SIPS aux UVB à trois et cinq stress subcytotoxiques répétés a montré que des caractéristiques de la sénescence apparaissaient dans des FDHs de peau. Ces caractéristiques étaient d'autant plus marquées que le nombre de stress et la dose d'UVB étaient élevés.

Nous avons donc étudié un modèle de SIPS à dix stress répétés afin de déterminer l'établissement des biomarqueurs de la sénescence chez ces fibroblastes de peau. Nous désirons également élargir notre analyse en étudiant d'autres gènes jouant un rôle dans la sénescence comme le TGF- β 1 et en utilisant la technique d'hybridation sur damier à ADNc.

Notre modèle consiste en une exposition des cellules FDHs de peau à une dose de 250 mJ/cm² d'UVB deux fois par jour pendant cinq jours suivis de deux jours de repos afin d'étudier les réponses aux stress à long terme c'est-à-dire 72 heures après les stress (Figure 12).

Pour valider ce modèle nous analysons plusieurs biomarqueurs de la sénescence répliquative comme l'activité SA β -galactosidase nous permettant d'estimer la proportion de cellules sénescents, la capacité de prolifération estimée via l'incorporation de thymidine tritiée, et le niveau protéique de p21^{WAF-1}, p16^{INK-4a} et p53 par la technique du Western Blot. l'expression de gènes connus pour être surexprimés en sénescence répliquative et dans une peau vieillissante *in vivo* grâce à la rétro-transcription suivie de la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (Real Time RT-PCR).

Enfin, nous réaliserons une hybridation de l'ADNc de cellules contrôles et soumises à ces stress aux UVB sur un damier à basse densité (SeneChips, EAT) afin de déterminer de façon plus générale cet état de SIPS induit par les UVB au niveau transcriptomique.

MATERIEL ET METHODES

La concentration en protéines se calcule comme suit :

$$\text{Concentration en } \mu\text{g/ml} = [\text{Cc}^\circ \text{ étalon}] \times \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc}}{\text{DO étalon} - \text{DO blanc}} \times \text{dilution}$$

Figure 13 : Formule utilisée lors d'un dosage de protéines par la méthode de Lowry.

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

1) Culture de fibroblastes de peau humaine

Les cellules sont des fibroblastes de peau humaine d'origine fœtale (AG04431). Ces cellules proviennent du "Coriell Cell Institute" (Etats-Unis).

Principe

Nous utilisons la méthode de culture classique décrite par Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961). Les cellules sont cultivées à 37 °C dans du milieu de culture BME : milieu basal de Eagle (Invitrogen, Grande-Bretagne) additionné de 10 % de FBS : sérum fœtal bovin (Invitrogen, Grande-Bretagne) ainsi que de : Pénicilline 50 U/ml, Streptomycine 50 µg/ml (Bio-Whittaker, Belgique) et de la L-Glutamine 2 mM (Sigma, Etats-Unis). Les cellules sont repiquées dans des conditions stériles quand elles arrivent à une densité moyenne de 20 000 cellules/cm² c'est-à-dire lorsqu'elles sont à confluence dans des boîtes de 75 cm² (T75).

2) Stress subcytotoxiques aux UVB

Modèle de SIPS réalisé par des stress subcytotoxiques répétés aux UVB (Figure 12).

Matériel

- BME, FBS, antibiotiques, L-Glutamine
- PBS : tampon phosphate salin (10 mM ; 0,9 % NaCl ; pH 7,4)
- Lampe UVB : TL 20W/01 (Philips, Pays-Bas)
- Radiomètre et capteur UVB (Bioblock Scientific, Belgique)

Méthode

- 72 h avant le premier stress, les cellules sont repiquées à 10 000 cellules/cm² dans du BME + 1 % FBS.
- Avant le stress, le milieu est décanté.
- Les cellules sont rincées 1 fois au PBS puis additionnées d'une fine couche de PBS et exposées à une dose de 250 mJ/cm² d'UVB par stress.
- Après le stress, le PBS est décanté et du BME + 1 % FBS est ajouté aux cellules qui sont ensuite replacées dans l'étuve à 37 °C + 5 % CO₂.

3) Dosage de protéines par la méthode de Lowry

(Lowry et al., 1951)

Principe

Les protéines dénaturées par le NaOH exposent tous leurs groupements aux réactifs. Dans une solution alcaline utilisée pour le dosage, les ions cuivriques complexent les protéines en se liant avec les atomes d'azote des liens peptidiques. De plus, le cuivre catalyse la réduction du complexe anion phosphomolybdate/phosphotungstate contenu dans le réactif de Folin-Ciocalteu par les résidus tyrosines et tryptophanes des protéines. Cette dernière réaction conduit à la formation d'un composé bleu. L'intensité de la coloration bleue est lue à 660 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes (Figure 13).

Matériel

- PBS : tampon phosphate salin (10 mM ; 0,9 % NaCl ; pH 7,4)
- BSA : Albumine de sérum bovin 200 µg/ml (Sigma, Etats-Unis)

- NaOH 0,5 N et 1 N (Merck, Allemagne)
- Solution alcaline à préparer juste avant l'emploi :
 - 2 % carbonate de sodium Na_2CO_3 (Merck, Allemagne)
 - 0,01 % sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Allemagne)
 - 0,02 % tartrate de sodium/potassium $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Allemagne)
- Réactif phénol de Folin-Ciocalteu 2x (Sigma, Etats-Unis)

Méthode

- Rincer les cellules 2 fois avec du PBS.
- Ajouter du NaOH 0,5 N pour lyser les cellules et laisser agir pendant 30 min.
- Homogénéiser les lysats à la pipette Pasteur et prendre 400 μl .
- Ajouter 2 ml de solution alcaline à chaque fraction de 20 sec en 20 sec et mélanger puis incubé 15 min.
- Ajouter 200 μl de Folin à chaque fraction de 20 sec en 20 sec et mélanger après 30 min d'incubation, lire la densité optique à 660 nm de 20 sec en 20 sec.
- Une courbe d'étalonnage est réalisée afin de déterminer la concentration en protéines.

4) Biomarqueurs de la sénescence répllicative

Détection de l'activité SA β -gal

Matériel

Solution de fixation :

- 2 % formaldéhyde (Belgolabo, Belgique)
- 0,2 % glutaraldéhyde (Fulka, Pays-Bas)
- Dilué dans du PBS : tampon phosphate salin (10 mM ; 0,9 % NaCl ; pH 7,4)

Solution de coloration :

- Tampon hydrogénophosphate de sodium 40 mM pH 6,0
 - NaH_2PO_4 (Merck, Allemagne)
 - Na_2HPO_4 (Merck, Allemagne)
- Ferrocyanure de potassium 5 mM (Merck, Allemagne)
- Ferricyanure de potassium 5 mM (Merck, Allemagne)
- NaCl 150 mM (Merck, Allemagne)
- MgCl_2 2 mM (Merck, Allemagne)
- 1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside (X-gal) (Eurogentec, Belgique)
solution stock à 20 mg/ml à diluer dans du N, N-diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique)

Méthode

- 48 h après les stress, les cellules sont repiquées à 1000 cellules/ cm^2 .
- Le lendemain, le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées 2 fois au PBS.
- Les cellules sont fixées 5 min dans la solution de fixation puis rincées 2 fois au PBS.
- La solution de coloration est alors ajoutée et on incube les cellules 12 à 16 h à 37 °C et sans CO_2 à l'abri de la lumière.
- Les cellules sont lavées 2 fois au PBS puis séchées au méthanol.

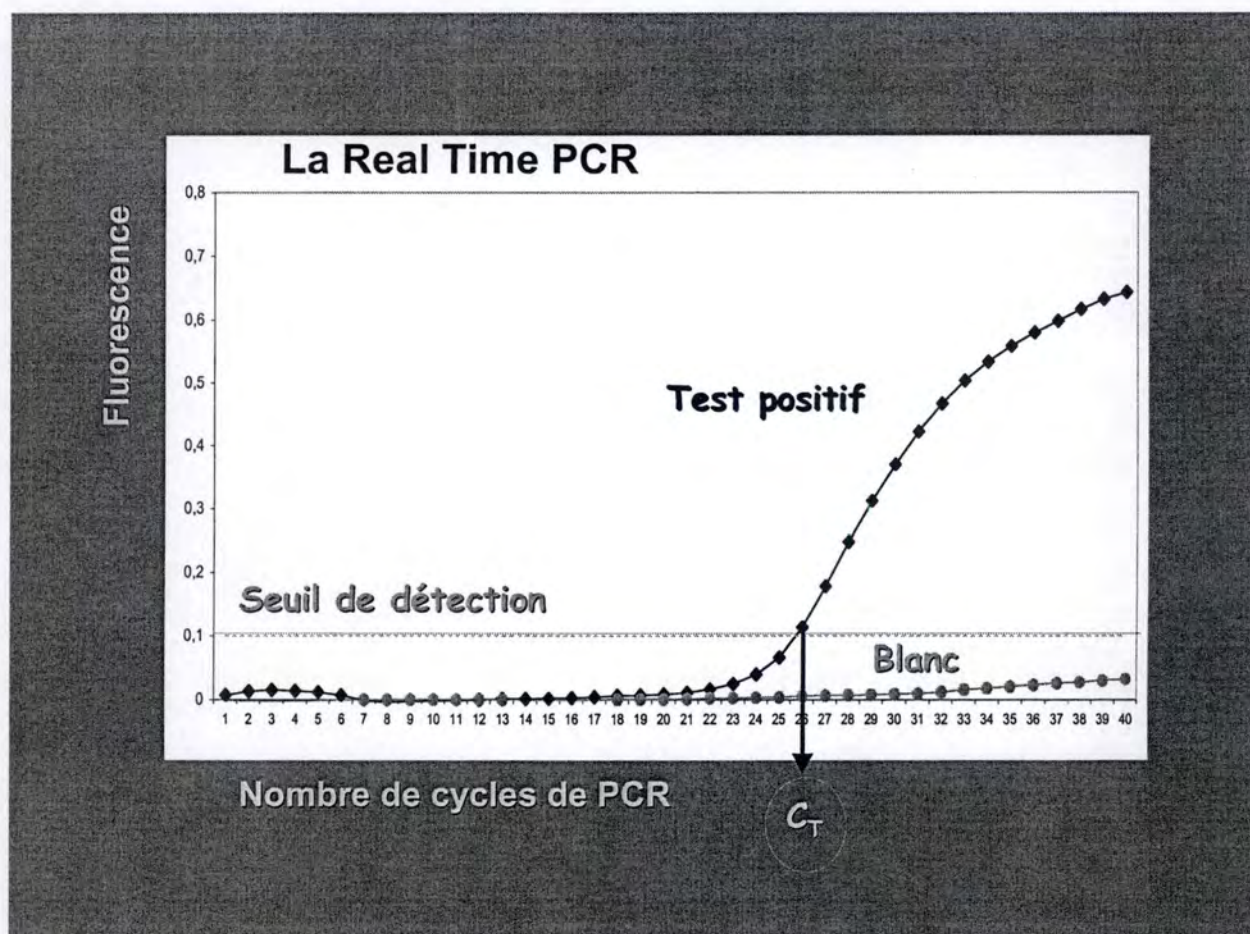


Figure 14 : Analyse de résultat de la Real Time RT-PCR.

Incorporation de thymidine tritiée

Matériel

- PBS, BME, FBS
- Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris 0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l NaHCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol (Invitrogen, Grande-Bretagne)
- Thymidine tritiée ([³H]-T) (NEN, Etats-Unis)
- Acide trichloroacétique (TCA) (SDS, France)
- Ethanol absolu (SDS, France)
- NaOH 0,5 N (Merck, Allemagne)
- HCl 0,5 N (Merck, Allemagne)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)
- Compteur à scintillation 2100 TR (Packard Instrument Company, Etats-Unis)

Méthode

- 48 h après les stress, les cellules sont repiquées à une confluence de 10 000 cellules/ cm² dans une plaque 24 puits avec du BME + 1 % FBS.
- Le lendemain, le milieu de culture est changé par du BME + 1 % FBS additionné de 1 µCi/ml de thymidine tritiée (= 1 µl [³H]-T/ml milieu).
- Les cellules sont incubées 48 h dans une étuve à 5 % de CO₂.
- Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS, 1 fois avec du TCA 10 % préalablement refroidi sur glace, 1 fois à l'éthanol 70 %, le dernier rinçage est réalisé avec du PBS.
- Les cellules sont lysées dans 250 µl de NaOH 0,5 N.
- La réaction est neutralisée au moyen de 250 µl d'HCl 0,5 N après 30 min.
- Après homogénéisation à la pipette Pasteur, les 500 µl de lyse sont repris dans une fiole à laquelle est ajouté 5 ml d'aqualuma et placée dans le compteur à scintillation.

5) Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)

Cette méthode permet de quantifier le niveau relatif d'ARNm transcrit pour différents gènes analysés dans notre modèle de SIPS.

La PCR permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle un fragment d'ADN grâce à un couple d'amorces encadrant le fragment à amplifier. Dans le cadre de la Real Time RT-PCR, la quantité d'amplicons produits est directement mesurable par l'intensité de fluorescence d'une molécule intercalante qui est ajoutée au mix PCR de départ (ici du SYBR GREEN). Cette molécule s'intercale entre les deux brins d'ADN, de façon non spécifique, et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin présente. Cette méthode permet donc de suivre l'amplification au fur et à mesure des cycles PCR au sein même du tube PCR. La lecture de l'intensité de fluorescence est permise grâce au couplage d'un fluorimètre et d'un thermocycleur au sein de l'appareil PCR. Le signal fluorescent est détecté à partir d'un certain seuil, ensuite on observe une augmentation exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation. Le cycle correspondant au milieu de la phase exponentielle est appelé Ct (« threshold cycle » ou cycle seuil) (Figure 14). C'est le cycle où le signal fluorescent est différencié du bruit de fond. Il est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible présent dans l'échantillon. L'évaluation de la quantité d'ADN se fait contre un standard. De plus, on réalise l'amplification du gène d'intérêt ainsi que celle d'un gène de référence qui lui ne varie pas dans les conditions étudiées. Un inconvénient de cette méthode est le risque d'amplification de produits parasites qui se fondent dans le signal

Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (Kb)
0,3	5,0-60
0,6	1,0-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2	0,1-2,0

Tableau 1 : Concentration en agarose en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer.

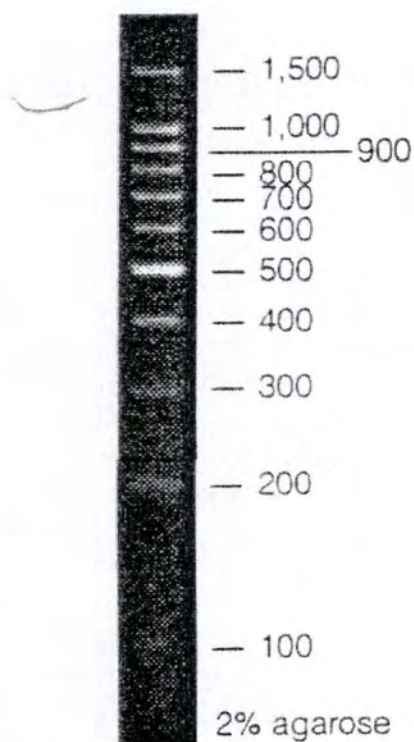


Figure 15 : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder) (Promega, Etats-Unis) permettant d'estimer la taille des fragments d'ADN lors d'électrophorèse en gel d'agarose.

fluorescent. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de contamination lors de la PCR, une courbe de dissociation peut être réalisée en augmentant progressivement la température de 60 °C jusqu'à 95 °C après la PCR, ce qui permet de déterminer les produits amplifiés sur base de leur température de melting (T_m). D'autre part, on peut également déposer sur gel d'agarose les produits PCR pour s'assurer que les produits amplifiés sont ceux attendus, ce qui permet de vérifier la taille des fragments (Tableau 1 et figure 15).

Extraction d'ARN total

Matériel

- PBS : tampon phosphate salin (10 mM ; 0,9 % NaCl ; pH 7,4)
- Kit RNAGents (Promega, Etats-Unis) :
 - Solution de dénaturation
 - Acétate de sodium 2 M pH 4,0
 - Phénol:chloroforme:isoamyl alcool
 - Isopropanol
- Ethanol absolu (Merck, Allemagne)
- Eau distillée (dH_2O)

Méthode

- Décanter le milieu des cellules sur glace, rincer 1 fois au PBS froid et décanter.
- Ajouter 300 μ l de solution de dénaturation et répartir cette solution sur toute la T75 en agitant. Verser le lysat dans une deuxième T75, racler la boîte et reverser le lysat dans un eppendorf.
- Ajouter 30 μ l d'acétate de sodium et mélanger puis ajouter 300 μ l de phénol:chloroforme:isoamyl alcool et laisser sur glace 15 min.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 20 min à 4 °C et récupérer la phase supérieure et la transférer dans un nouvel eppendorf.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol et incubé à -20 °C pendant 30 min.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4 °C et resuspendre le culot dans 500 μ l de solution de dénaturation.
- Ajouter un volume égal d'isopropanol et mettre à -20 °C pendant 30 min.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4 °C et laver le culot avec 1 ml d'éthanol 75 % refroidi sur glace.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 10 min et laisser sécher le culot (ARN total) puis resuspendre dans 20 μ l d'eau distillée. Doser au spectrophotomètre.

Rétro – transcription d'échantillon d'ARN

Matériel

- Eau distillée RNase Free (Promega, Etats-Unis)
- Oligo dT 500 ng/ μ l (Invitrogen, Etats-Unis)
- Tampon 5x pour la Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Etats-Unis)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, Etats-Unis)
- RNAsine 40 U/ μ l (Promega, Etats-Unis)
- dNTP mix 250 μ M (Eurogentec, Belgique)
- Superscript II Reverse Transcriptase 200 U/l (Invitrogen, Etats-Unis)
- RNase H 2 U/ μ l (Invitrogen, Etats-Unis)

Gènes	Amorces	
	nom	Séquence (sens 5'-3')
apo J	APO J-937F APO J-1050R	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG CAG CGA CCT GGA GGG ATT C
Fibronectine	fibronectine-343F fibronectine-451R	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT
FN1 var 2	FN1 var2-19F FN1 var2-157R	AACCTTGATACTGAGTCTCCT AATTGACCACATATTGTTTGTCTCACTAA
Ostéonectine	osteonectine-868F osteonectine-982R	GAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA
SM22	SM22-511F SM22-606R	CGT GGA GAT CCC AAC TGG TT AAG GCC AAT GAC ATG CTT TCC
COL1A1	COL1A1-51F COL1A1-141R	CCC AAG GAC AAG AGG CAT GT CAT CGG CAG GGT CGG AG
COL1A2	COL1A2-82F COL1A2-179R	CAT GCC GTG ACT TGA GAC TCA GAT TAC TTT GAT AGC ATC CAT AGT GAC TC
MMP-1	MMP-1-77F MMP-1-225R	CAT GCG CAC AAA TCC CTT CTA GAA CAG CCC AGT ACT TAT TCC CTT T
MMP-2	MMP-2-305F MMP-2-420R	ATC GAC GAT GCC TGG AAT G CTT TGG TTC TCC AGC TTC AGG TAA T
c-jun	jun-215F jun-302R	GGA TCA AGG CGG AGA GGA A TCC AGC CGG GCG ATT
c-fos	FOS-29F FOS-123R	TCA CCC GCA GAC TCC TTC TC GTG GGA ATG AAG TTG GCA CTG
p53	p53-76F p53-150R	AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA
p21 ^{WAF-1}	p21-106F p21-228R	CTG GAG ACT CTC GAA GTC GAA CCA GGA CTG CAG GCT TCC T
TGF- β 1	TGF1-34F TGF1-135R	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA
GAPDH	GAPDH-43F GAPDH-153R	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA
RPL13A	RPL13A-387F RPL13A-480R	CTC AAG GTC GTG CGT CTG AA TGG CTG TCA CTG CCT GGT ACT

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées lors de ce mémoire.

Méthode

- Préparation du mix d'ARN :
 - 2 µg d'ARN total
 - 500 ng d'oligo dT
 - Ajuster à 10 µl avec de l'eau RNase-free
- Chauffer le mix 10 min à 70 °C, mélanger et refroidir sur glace 5 min et mélanger.
- Ajouter par tube :
 - 4 µl Tampon 5x
 - 2 µl DTT 0,1 M
 - 1 µl RNAsine
 - 2 µl dNTP mix
- Mélanger doucement et incubé 2 min à 42 °C.
- Ajouter 1 µl de Superscript II par tube, mélanger et incubé 1 h à 42 °C.
- Arrêter la réaction 15 min à 70 °C.
- Ajouter 1 µl de RNase H, mélanger et incubé 20 min à 37 °C puis congeler à -20 °C.

Real Time RT-PCR

Recherche de couples d'amorces appropriés

Le programme Primers Express (Applied Biosystems, Pays-Bas) permet de choisir des couples d'amorces répondant à différentes contraintes. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb afin d'obtenir une amplification optimale, celle des amorces varie entre 15 et 30 pb et leur contenu en C/G doit représenter 20 à 70 % de la séquence nucléotidique. Les amorces ne peuvent contenir au maximum 2 G et/ou C parmi les cinq derniers nucléotides à l'extrémité 3' afin de minimiser l'hybridation entre eux. De plus la température de melting des deux amorces doit se situer entre 58 et 60 °C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2 °C entre les deux amorces. La liste des amorces est reprise au tableau 2.

Optimisation de la concentration en amorces

Les amorces sens et anti-sens du gène d'intérêt sont tout d'abord testées dans trois concentrations différentes (50 nM, 300 nM, 900 nM) afin de déterminer la concentration pour laquelle l'amplification des amorces est optimale (Ct faible) et où l'amplification des NTC (No Template Control) est minimale (Ct élevé).

Matériel

- SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- 96-wells Optical Reaction Plate (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- Optical Adhesice Covers (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- Sequence Detection System ABI Prim 7000 (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- dH₂O

Méthode

Préparation du mix :

- 2,5 µl d'amorce sens (à la concentration optimale)
- 2,5 µl d'amorce anti-sens (à la concentration optimale)
- 12,5 µl SYBR GREEN
- 2,5 µl dH₂O

- 5 µl de ADNc ou dH₂O (blanc)

Cycles de Real Time RT-PCR

Dénaturation de 5 min à 95 °C.

Série de 40 cycles :

- dénaturation 15 sec à 95 °C.
- hybridation – élongation 1 min à 65 °C.

Analyse des résultats

Il faut déterminer le Ct pour chaque gène en ajustant le seuil de détection dans la zone exponentielle d'amplification. Ensuite, le ΔCt de chaque condition est calculé pour chaque gène ($\Delta Ct = Ct$ de la condition contrôle - Ct de la condition de stress). Ensuite, on calcule l'efficacité E d'amplification pour chaque gène ($E = 10^{-1/\text{pente de la courbe standard}}$) ; ainsi que leur efficacité $E^{\Delta Ct}$ ou $E^{\Delta Ct}$ ($E^{\Delta Ct} = E$ propre au gène exposant ΔCt). Enfin, on normalise les résultats en effectuant le ratio de chaque $E^{\Delta Ct}$ pour les gènes d'intérêts sur l' $E^{\Delta Ct}$ d'un gène de référence ($E^{\Delta Ct}$ du gène d'intérêt/ $E^{\Delta Ct}$ du gène de référence) (Pfaffl, 2001).

6) Western Blot

Matériel

- Tampon d'échantillon 4x NuPage LDS (Invitrogen, Etats-Unis)
- See Blue Plus 2 Pre Stained Standard 1x (Invitrogen, Etats-Unis)
- Tampon de migration 20x NuPage MOPS SDS (Invitrogen, Etats-Unis)
- NuPage Antioxydant (Invitrogen, Etats-Unis)
- Bis-Tris Gel NuPage 4-12 % 1,5 mm x 10 wells (Invitrogen, Etats-Unis)
- Cuve XCell Surelock (Invitrogen, Etats-Unis)
- Xcell II Blot Module (Invitrogen, Etats-Unis)
- Générateur Power pac 300 (Bio Rad, Grande-Bretagne)
- Tampon de transfert 20x NuPage (Invitrogen, Etats-Unis)
- Méthanol (ARCOS organic, Etats-Unis)
- Papier Whatman (Merck, Allemagne)
- Membrane Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech, Suède)
- TBS (10x ; 2,422 % NaCl ; 8,006 % Tris ; pH = 7,6)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Etats-Unis)
- TBS-T (1x ; 10 % TBS 10x ; 0,1 % Tween 20)
- Lait écrémé en poudre Gloria (Nestlé, Belgique)
- Anticorps primaires et secondaires (Tableau 3).
- ECL Advance Western Blotting Detection kit (Amersham Biosciences, Grande-Bretagne)
- Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne)
- Révélateur papier pour machine (Ilford 200RT, Grande-Bretagne)
- Fixateur papier pour machine (Ilford 200RT, Grande-Bretagne)
- Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce, Etats-Unis)

Méthode

Préparation des échantillons et migration

- Tampon de lyse :
 - 2 % SDS (Merck, Allemagne)
 - 10 mM Tris (Merck, Allemagne)
 - 1 mM EDTA pH 6,8 (Merck, Allemagne)

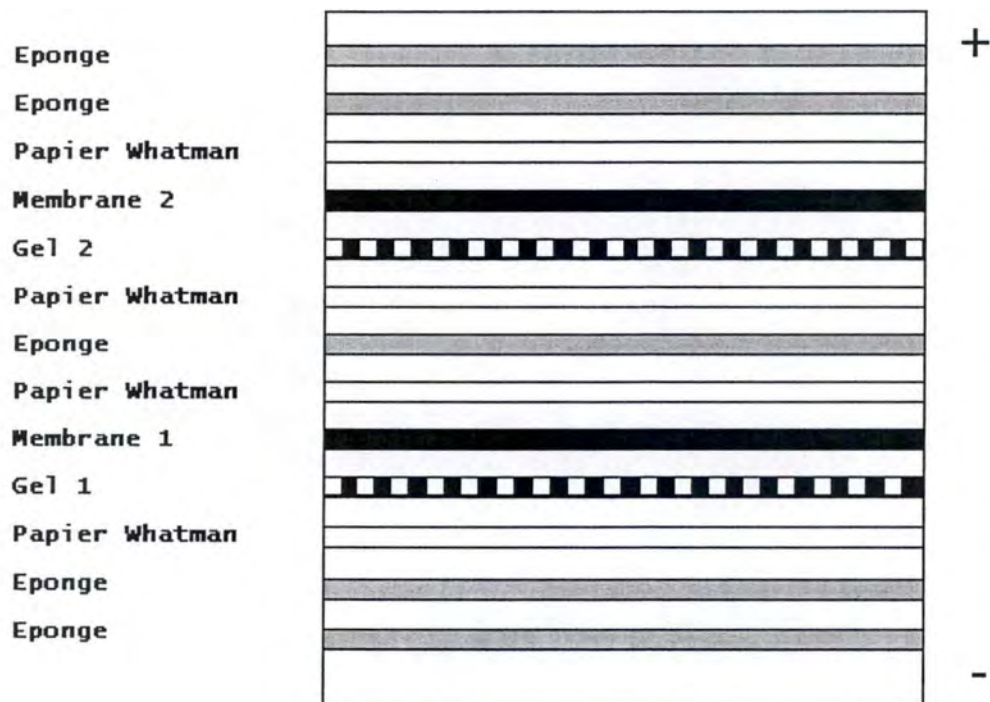


Figure 16 : Système pour le transfert du gel sur membrane.

Anticorps primaires
p53-sc 6243 (Santa Cruz Biotechnology, Etats-Unis)
p21-sc 6246 (Santa Cruz Biotechnology, Etats-Unis)
p16-sc 468 (Santa Cruz Biotechnology, Etats-Unis)
α -tubuline AM2495-11 (Innogenex, Etats-Unis)

Anticorps secondaires
Anti-rabbit-NA 934 V (Amersham Biosciences, Suède)
Anti-mouse-NA 931 V (Amersham Biosciences, Suède)

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés lors de ce travail.

- Anti-protéase « complète » (Roche, Allemagne)
- Préparation des échantillons : 30 µg d'échantillon + tampon d'échantillon 4x.
- Les échantillons sont chauffés 10 min à 70 °C. Puis centrifugés 10 min à 13 000 rpm.
- Les échantillons sont chargés dans les puits ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire.
- La migration est réalisée à 200 Volts pendant +/- 50 min dans le MOPS 1x.

Transfert des gels sur membrane

- On prépare le système sandwich de blotting (Figure 16).
- La membrane est rincée 1 min dans un bain de méthanol et 5 min dans le tampon de transfert NuPage dilué 1x avec 10 % de méthanol.
- Le gel est ensuite démoulé et placé dans le système sandwich pour la migration.
- Le transfert se fait ensuite 2 h 30 à 30 Volts dans le tampon de transfert.

Lavages des membranes

- Le système est démoulé.
- La membrane est bloquée 1 h dans du TBS-T + 5 % gloria.
- La membrane est incubée 1 h (ou toute la nuit à 4 °C) avec l'anticorps primaire dans du TBS-T + 5 % gloria.
- La membrane est lavée 3 fois 5 min dans du TBS-T + 5 % gloria.
- La membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire dans du TBS-T + 5 % gloria.
- La membrane est lavée 5 min dans du TBS-T + 5 % gloria, 2 fois 5 min dans du TBS-T sans gloria et 10 min dans du TBS-T sans gloria.

Révélation – déshybridation des anticorps

- On révèle la membrane en utilisant le kit de révélation sensible ECL Advance.
- Puis un film ECL mis en présence de la membrane est développé en chambre noire.
- Ensuite, les anticorps peuvent être détachés de la membrane en incubant 15 min la membrane avec le tampon Restore.

7) Hybridation sur damier à ADNc à basse densité

Extraction d'ARNm

Matériel

- PBS, BME, FBS
- Trypsine à 0,25 % dans un tampon Tris 0,4 g/l KCl ; 2,2 g/l NaHCO₃ ; 6,8 g/l NaCl ; 1 g/l glucose ; 0,5 mg/l rouge phénol (Invitrogen, Grande-Bretagne)
- Kit microFastTrack (Invitrogen, Etats-Unis) :
 - Tampon stock
 - Dégradeur Protéine/RNase
 - Tampon de liaison
 - Tampon de lavage Low Salt
 - Tampon d'élution
 - Acétate de Sodium 2 M
 - NaCl 5 M
 - Glycogen Carrier
 - Poudre de cellulose Oligo(dT) 20-30 préparé
 - Colonnes de centrifugation
 - Microtubes
- Eau nucléase-free (Promega, Etats-Unis)

- Seringue 2 ml + aiguille stérile 21G (Terumo, Belgique)

Méthode

Sous hotte

- Rincer les cellules au PBS, les trypsiniser, les resuspendre dans du milieu BME + 10 % FBS puis les centrifuger à 1000 rpm pendant 7 min.
- Laver le culot avec du PBS froid et centrifuger à 1000 rpm pendant 7 min.
- Resuspendre le culot dans du PBS froid.

Zone RNASE-FREE

a) Isolation de l'ARNm

- Transvaser dans des eppendorfs et centrifuger à 2000 rpm pendant 5 min à 4 °C.
- Resuspendre chaque culot dans du tampon de lyse, lui-même composé de tampon stock + du dégradeur Protéine/RNase et laisser 1 min à 45 °C.
- Passer 3-4 fois dans une seringue dotée d'une aiguille 21G et incubé 20 min à 45 °C.
- Ajouter du NaCl 5 M et bien mélanger par inversion.
- Passer 3-4 fois dans une seringue.
- Transvaser dans une fiole contenant la cellulose oligo(dT) en prenant soin de dissoudre le bloc de poudre puis laisser gonfler 2 min.
- Agiter légèrement, sur tapis roulant, pendant 20 min.
- Culoter la cellulose à 6000 rpm pendant 5 min, décanter le surnageant.

b) Lavage de la cellulose

- Laver 3 fois la cellulose dans du tampon de liaison en centrifugeant à 6000 rpm pendant 5 min entre chaque lavage, écarter ce qui passe après centrifugation.
- Resuspendre la cellulose dans du tampon de liaison et transvaser sur une colonne de centrifugation.
- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec et écarter ce qui est passé à travers la membrane. Laver 3 fois la cellulose dans du tampon de liaison.
- Laver 2 fois la cellulose dans du tampon de lavage et centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec entre chaque lavage, écarter ce qui passe après centrifugation.

c) Elution et précipitation de l'ARN

- Resuspendre dans du tampon d'élution et centrifuger à 6000 rpm pendant 10 sec sans écarter ce qui est passé au travers de la membrane = ARN élué.
- Ajouter du Glycogen Carrier, de l'acétate de sodium et de l'éthanol et mélanger.
- Incuber 30 min (ou toute la nuit) à -75°C.
- Centrifuger à 16 000 rpm pendant 15 min à 4°C.
- Ecarter toute trace d'éthanol et laisser sécher le culot d'ARNm environ 10 min.
- Resuspendre dans de l'eau nucléase-free et quantifier la concentration de l'échantillon.

Retro-transcription de l'ARNm

Matériel

- Standards Internes :
 - CAB 10 ng/μl
 - RBcL 1 ng/μl
 - RCA 0,1 ng/μl
- Oligo dT (Invitrogen, Etats-Unis)

- Eau nuclease-free (Promega, Etats-Unis)
- Tampon RT 5x (Invitrogen, Grande-Bretagne)
- 1,4-dithio-DL-threitol (DTT) 0,1 μ M (Invitrogen, Etats-Unis)
- Inhibiteur Ribonucléaire RNAsin (40 U/ μ l) (Promega, Etats-Unis)
- dATP 100mM (Roche, Allemagne)
- dGTP 100mM (Roche, Allemagne)
- dTTP 100mM (Roche, Allemagne)
- dCTP 10mM (Roche, Allemagne)
- dCTP biotinylé 1mM (Roche, Allemagne)
- Superscript II Rnase H Reverse transcriptase (200 U/ μ l) (Invitrogen, Etats-Unis)
- Ribonucléase H (RNase H) (2U/ μ l) (Invitrogen, Etats-Unis)

Méthode

- Préparer le mix de RT et mélanger :
 - 1 μ l de chaque standard interne (3)
 - 2 μ l d'oligo dT
 - 500 ng ARNm
 - Eau nuclease-free pour obtenir un volume total de 9.5 μ l
- Incuber le mix de RT 10 min à 70 °C et mélanger.
- Incuber directement sur glace pendant 5 min et mélanger.
- Préparer le mix de dNTP composé de :
 - 4 μ l de dATP
 - 4 μ l de dTTP
 - 4 μ l de dGTP
 - 6,4 μ l de dCTP
 - 64 μ l de dCTP biotinylés
- Préparer le mix de réaction composé de :
 - 4 μ l de tampon RT 5x
 - 2 μ l de DTT 0,1 M
 - 1 μ l de RNAsin
 - 2 μ l du mix de dNTP
- Ajouter 9 μ l du mix de réaction par échantillon et mélanger.
- Incuber à température ambiante pendant 5 min et mélanger.
- Ajouter 1,5 μ l de SuperScript RII reverse transcriptase par tube et mélanger.
- Incuber 1 h 30 à 42 °C et mélanger.
- Rajouter 1,5 μ l de SuperScript RII reverse transcriptase par tube et mélanger.
- Incuber 1 h 30 à 42 °C, stopper la réaction 15 min à 70 °C, mélanger.
- Ajouter 1 μ l de Rnase H par tube, mélanger et incuber 20 min à 37 °C, mélanger.
- Mettre à 95 °C pendant 3 min, mélanger et congeler à -20 °C.

Hybridation sur damier

Matériel

- Lames de verre spottées SeneChips (EAT, Belgique)
- Tampon d'hybridation A (EAT, Belgique)
- Tampon d'hybridation B (EAT, Belgique)
- ADNc
- ADN cible pour le contrôle positif 50 nM
- dH₂O
- Chambre d'hybridation (EAT, Belgique)

- Tampon B1 (EAT, Belgique)
- Tween 20 (Sigma, Etats-Unis)
- Lait en poudre Gloria 10 mg (Nestlé, Suisse)
- Anticorps conjugué anti-biot-cy3 (Lucron Bioproduct,)
- Thermomixeur (Eppendorf, Allemagne)

Méthode

Hybridation

- Préparer le mix d'hybridation :
 - 6,5 µl tampon d'hybridation A
 - 26 µl tampon d'hybridation B
 - 22,5 µl ADNc
 - 2 µl contrôle positif
 - 8 µl dH₂O
- Placer les échantillons à 60 °C.
- Placer les chambres d'hybridation sur les lames et y déposer les 65 µl du mix d'hybridation.
- Recouvrir de couvre-objets souples.
- Mettre les lames dans un thermomixeur à 1400 rpm à 60 °C toute la nuit.

Lavages

- Retirer les couvre-objets et les chambres d'hybridation.
- Laver 4 fois 2 min les lames dans du B1 0,1x + Tween 0,1% (B1-T) .

Détection

- Mettre la lame 45 min avec du tampon B1 1x + anti-biotine-cyanine 3 (dilution 1000x).
- Laver 5 fois 2 min les lames avec du B1- T et 2 fois 2 min avec du dH₂O.
- Mettre 5 min dans la centrifugeuse à 600 rpm pour faire sécher les lames.

Scan des damiers

A l'aide du programme « Imagen » (Biodiscovery, USA) nous scannons les damiers à trois gains différents 50, 70, 100 avec le laser GMS 418 Array Scanner (Genetic MicroSystems, USA). Le gain 50 nous permet de voir les gènes qui sont fortement exprimés tandis que le gain 100 permet de voir les gènes qui sont plus faiblement exprimés. Les images obtenues sont quantifiées avec ce programme. Ce dernier permet de déterminer la moyenne des intensités de chaque pixel à l'intérieur d'un spot. Les valeurs obtenues par l'intermédiaire de ce programme vont permettre de déterminer la variation d'expression de gènes d'une situation test par rapport à une situation contrôle.

Analyse des résultats

Chaque moyenne test est divisée par la moyenne contrôle qui lui correspond par le programme d'analyse GMS 418 (Genetic MicroSystems, USA). Ce rapport est réalisé entre des valeurs correspondant à un même gène et ayant été obtenues à un gain identique. Grâce aux standards internes, une normalisation de la transcription inverse, de l'hybridation et de la révélation est réalisée ce qui permet de réduire les variations possibles de ces étapes. Enfin les gènes de référence permettent une deuxième normalisation sur l'ensemble du damier afin de réduire les variations biologiques pouvant exister entre les damiers. Les valeurs obtenues correspondent aux variations d'expression des gènes.

RESULTATS,
DISCUSSIONS ET
PERSPECTIVES

PARTIE III : RESULTATS

Lors de ce mémoire, nos travaux ont porté sur un modèle de sénescence induite prématurément par des stress subcytotoxiques aux UVB sur des fibroblastes humains de peau d'origine foetale.

Le modèle que nous avons utilisé dans le cadre de cette étude est basé sur deux stress par jour pendant cinq jours (cfr matériel et méthodes) suivi d'une période de repos de deux jours afin d'étudier la réponse à long terme aux stress.

Deux contrôles sont réalisés dans ce modèle : tout d'abord les cellules « jours zéro » (j0) représentant l'état des cellules avant tout stress et les cellules « contrôles » (CTL) subissant les mêmes conditions de culture que les cellules stressées mais qui ne sont jamais exposées aux UVB. Les cellules j0, CTL ainsi que les cellules stressées sont issues d'une même lignée de culture et ont subi le même nombre de passages en culture (DCP 27-29). Ceci correspond environ à 56 % de leur durée de vie proliférative. Nous avons également utilisé des cellules sénescents (DCP 40) soit à environ 90 % de leur durée de vie proliférative.

Plusieurs biomarqueurs du vieillissement ont été analysés lors de ce travail. Tout d'abord, nous avons étudié l'activité de la SA β -gal, ensuite nous avons estimé la capacité proliférative par un test d'incorporation de la [3 H]-thymidine dans l'ADN ainsi que par l'étude du niveau de p21^{WAF-1}, p16^{INK-4a} et p53 par Western Blot, enfin nous avons étudié l'expression de différents gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence répliquative par la méthode de Real Time RT-PCR.

Ce modèle validé, nous avons décidé de réaliser une étude transcriptomique à plus grande échelle par l'utilisation d'un damier à ADN afin de caractériser de façon plus générale le phénotype de sénescence prématurée observé dans ce modèle.

Etude des biomarqueurs de la sénescence

1) Activité β -galactosidase associée à la sénescence

L'activité de la SA β -gal a été mise en évidence par l'équipe de Dimri et al. (Dimri et al., 1995). L'activité de cette enzyme spécifique à la sénescence est facilement détectable par un test histochimique en incubant les cellules préalablement fixées avec du X-gal, substrat de la réaction enzymatique, à pH 6.

Nous constatons que la proportion de cellules positives augmente de l'ordre de 2,1 fois entre les cellules jeunes et les cellules sénescents (Figure 17). En ce qui concerne les cellules stressées nous observons une augmentation de 1,9 fois par rapport aux cellules CTL. Nous retrouvons donc une augmentation de la proportion de cellules positives pour cette activité aussi bien dans les cellules en sénescence répliquative que dans les cellules soumises aux stress aux UVB. Notons que la proportion de cellules positives dans les cellules sénescents est moins élevée que dans d'autres souches de fibroblastes sénescents comme les cellules WI-38 et IMR-90 (Dumont et al., 2000b), (Fripiat et al., 2001).

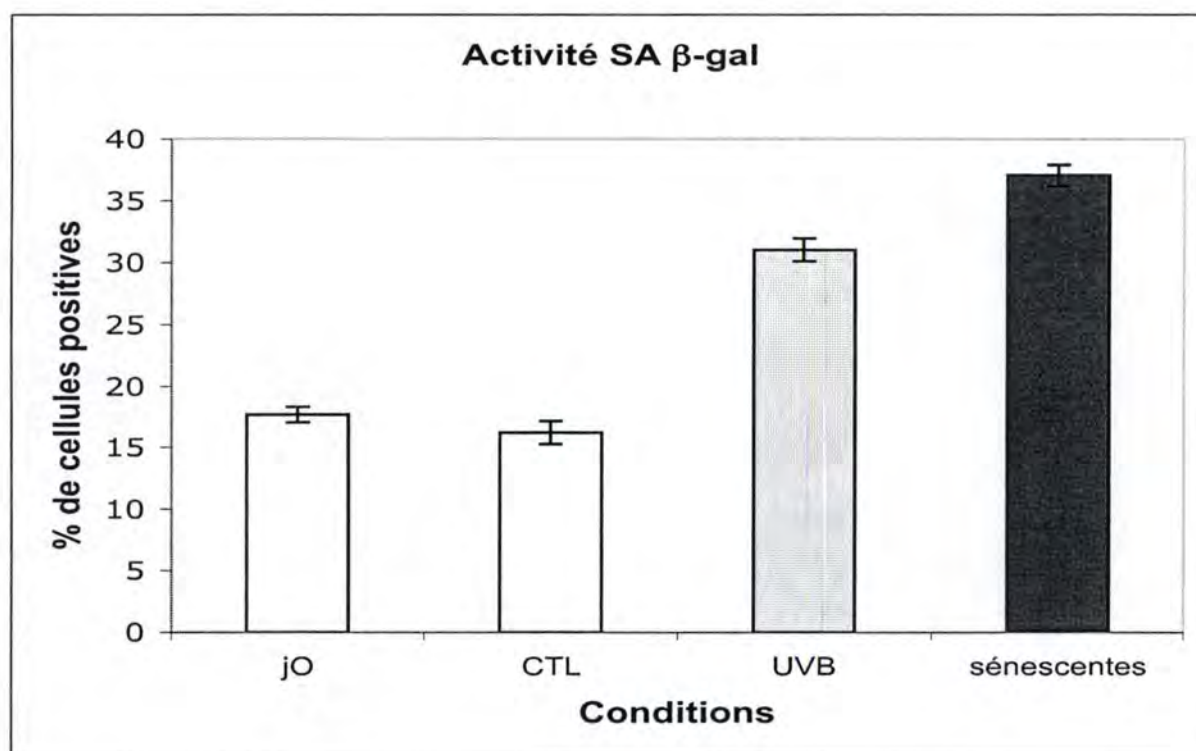


Figure 17 : Etude de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence chez des FDHs de peau. Nous analysons l'activité SA β -gal chez des FDHs jeunes (DCP 27-29) avant les stress (j0), chez des FDHs jeunes (DCP 27-29) subissant les mêmes conditions de culture mais non soumis au stress, des FDHs jeunes (DCP 27-29) soumis aux UVB et des FDHs sénescents (DCP 40).

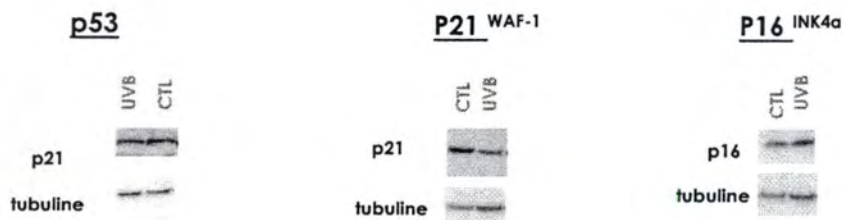
2) Capacité de prolifération

Une des caractéristiques principales des cellules sénescents est leur arrêt irréversible du cycle cellulaire. Afin d'étudier la capacité proliférative de nos cellules, nous avons réalisé deux tests. Le premier est un test d'incorporation de la [3 H]-thymidine, le deuxième est une étude au niveau protéique, par Western Blot, d'inhibiteurs du cycle cellulaire.

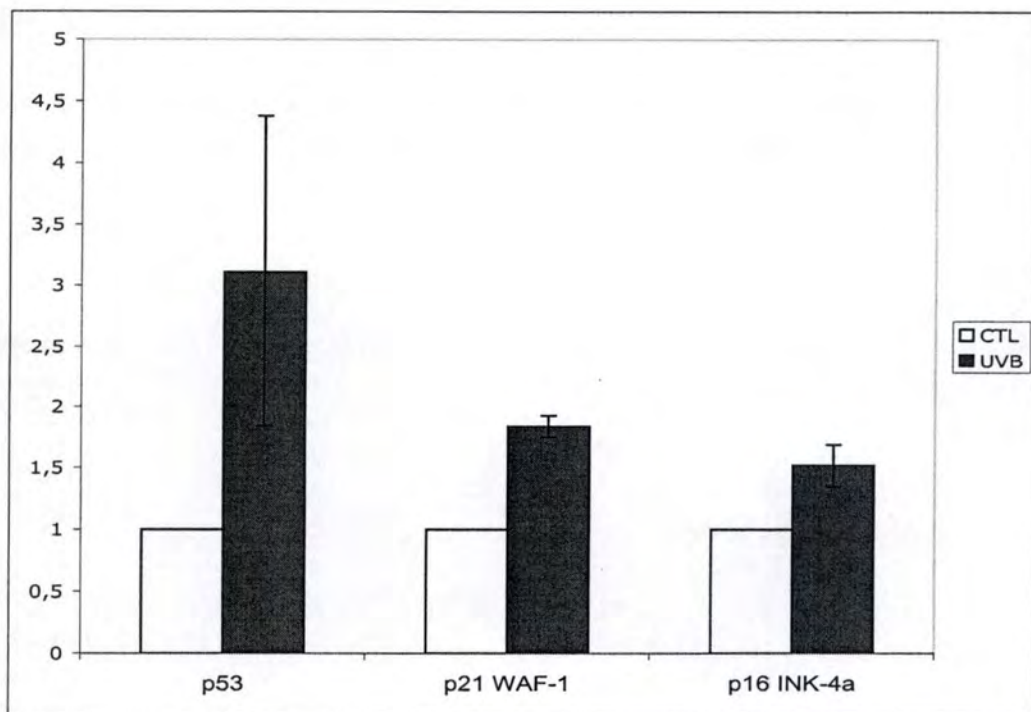
a) Incorporation de [3 H]-thymidine

Tout d'abord, nous avons mis en évidence une chute de 1,5 fois d'incorporation de [3 H]-thymidine entre les cellules j0 et les cellules sénescents ainsi qu'une diminution de 4,3 fois de l'incorporation de [3 H]-thymidine entre les cellules CTL et les cellules stressées, ce qui suggère une forte diminution de la synthèse d'ADN chez les cellules stressées et donc explique en partie l'arrêt prolifératif (Figure 18).

Rappelons que nous avons normalisé les valeurs de radioactivité en les divisant par la quantité en protéines cellulaires et que nous les avons exprimées en pourcentage en fonction de la valeur obtenue chez les cellules contrôles.



a



b

Figure 19 : Analyse d'inhibiteurs du cycle cellulaire. **a :** Etude par Western Blot d'inhibiteur du cycle cellulaire p53, p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a}. **b :** Mesure de la quantité en protéines de ces inhibiteurs dans des FDHs jeunes (DCP 27-29) subissant les mêmes conditions de culture que les cellules stressées mais n'étant pas soumises aux UVB et dans les FDHs subissant la SIPS.

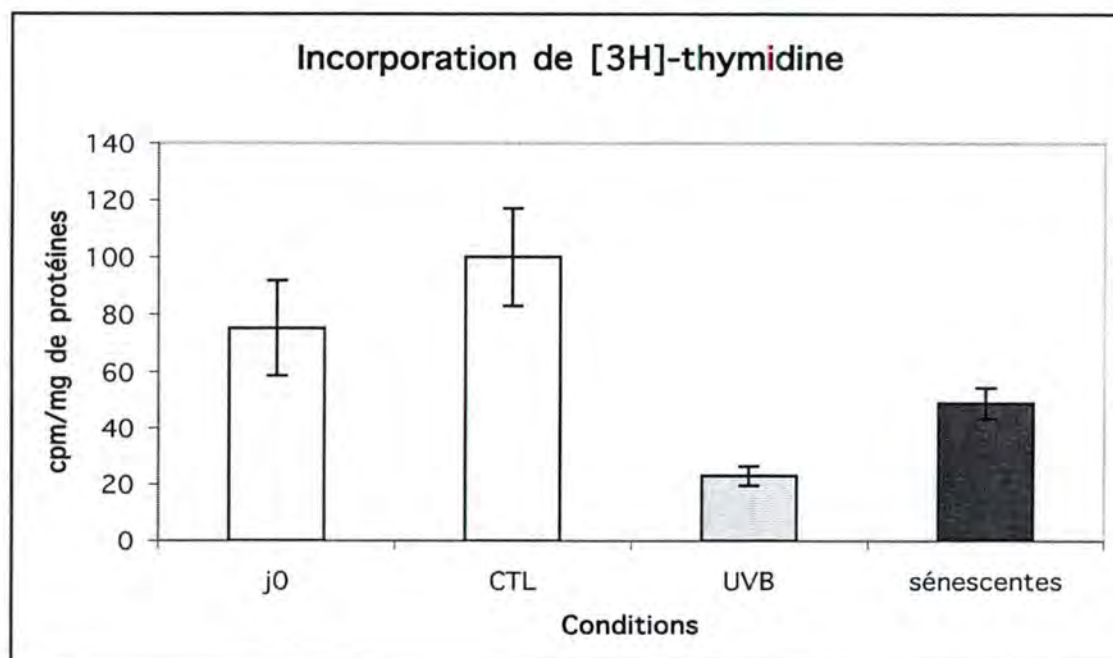


Figure 18 : Estimation de la capacité de prolifération des FDHs de peau. Nous étudions la capacité de prolifération des cellules par l'incorporation de [3 H]-thymidine chez des FDHs jeunes (DCP 27-29) avant les stress (j0), chez des FDHs jeunes (DCP 27-29) subissant les mêmes conditions de culture mais non soumis au stress, des FDHs jeunes (DCP 27-29) soumis aux UVB et des FDHs sénescents (DCP 40).

b) Etude d'inhibiteurs du cycle cellulaire

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux inhibiteurs du cycle cellulaire p53, p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a}. Nous avons analysé leur niveau protéique par Western Blot dans les cellules CTL et les cellules stressées (Figure 19 a).

Nous constatons qu'il y a une augmentation de 3,1 fois la quantité de p53 chez les cellules stressées par rapport aux cellules CTL. En ce qui concerne p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} nous remarquons également une augmentation de l'ordre de 1,8 fois pour p21^{WAF-1} et de 1,5 fois pour p16^{INK-4a} entre les cellules stressées et les cellules CTL (Figure 19 b). Cette augmentation de la quantité de ces principales protéines inhibitrices du cycle cellulaire peut en partie expliquer la diminution de la capacité de prolifération observée par le test d'incorporation de la [3 H]-thymidine.

3) PCR en temps réel

Nous avons ensuite étudié le niveau d'expression de différents gènes dont le niveau d'expression est connu pour être modifié en sénescence répliative. En effet, outre l'arrêt irréversible de la division cellulaire et l'apparition de l'activité de la SA β -gal, les cellules sénescents se caractérisent par une modification dans leur expression génique.

Parmi les gènes analysés, nous avons repris des gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence tels que l'apolipoprotéine J, la fibronectine, l'ostéonectine et SM22 (Gonos et al., 1998).

Nous nous sommes également intéressés à d'autres gènes jouant un rôle dans la MEC comme le variant 2 de la fibronectine, les gènes codant pour la chaîne $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du procollagène I et les métalloprotéinases MMP-1 et MMP-2.

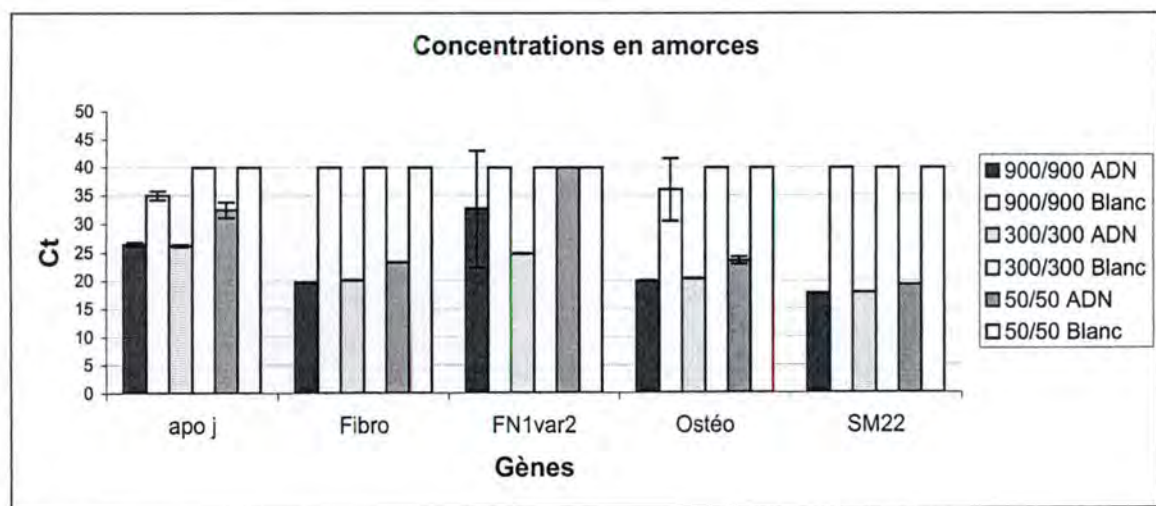
Au niveau de la voie de transduction du signal, nous avons choisi les gènes c-fos et c-jun formant le facteur de transcription AP-1, le gène de p53 et le gène codant pour la CDKI p21^{WAF-1}.

Nous nous sommes également demandés si le TGF- β 1 pouvait jouer un rôle dans la sénescence induite prématurément par notre modèle comme cela avait été le cas dans l'étude de SIPS induite par H₂O₂ menée par notre équipe (Fripiat et al., 2001). C'est pourquoi le niveau d'expression du gène codant pour le TGF- β 1 est également étudié.

Nous avons donc analysé le niveau relatif d'ARNm de ces gènes par la méthode de PCR en temps réel en prenant comme niveau de référence la quantité d'ARNm de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) ainsi que du gène RPL13A codant pour la protéine ribosomale 23kDa HBP dont le niveau d'expression ne change pas dans notre modèle.

Cette technique demande plusieurs mises au point. Tout d'abord, les amorces sens et anti-sens doivent être choisies en respectant un certain nombre de contraintes (cfr matériel et méthodes). Ensuite, différentes concentrations en amorces doivent être testées afin d'obtenir la meilleure amplification possible. Enfin, on vérifie sur gel d'agarose la taille des amplicons obtenus. Si toutes ces étapes sont satisfaisantes, l'étude du niveau d'expression des gènes peut être réalisée.

Nous avons utilisé les trois combinaisons de concentrations en amorces (sens/anti-sens) recommandées par le protocole de la PCR en temps réel (Applied Biosystems, Pays-Bas) : 900 nM/900 nM, 300 nM/300 nM, 50 nM/50 nM. Les cycles seuil (« threshold cycle » en anglais ou Ct) de ces différentes combinaisons sont comparés. Le Ct indique le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection. Ce seuil de détection représente une intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base (Salmon, 2002) (Figure 14). La concentration optimale est celle qui permet une forte amplification de l'ADN (Ct faible) sans avoir d'amplification au niveau du blanc (Ct élevé) (Figure 20).



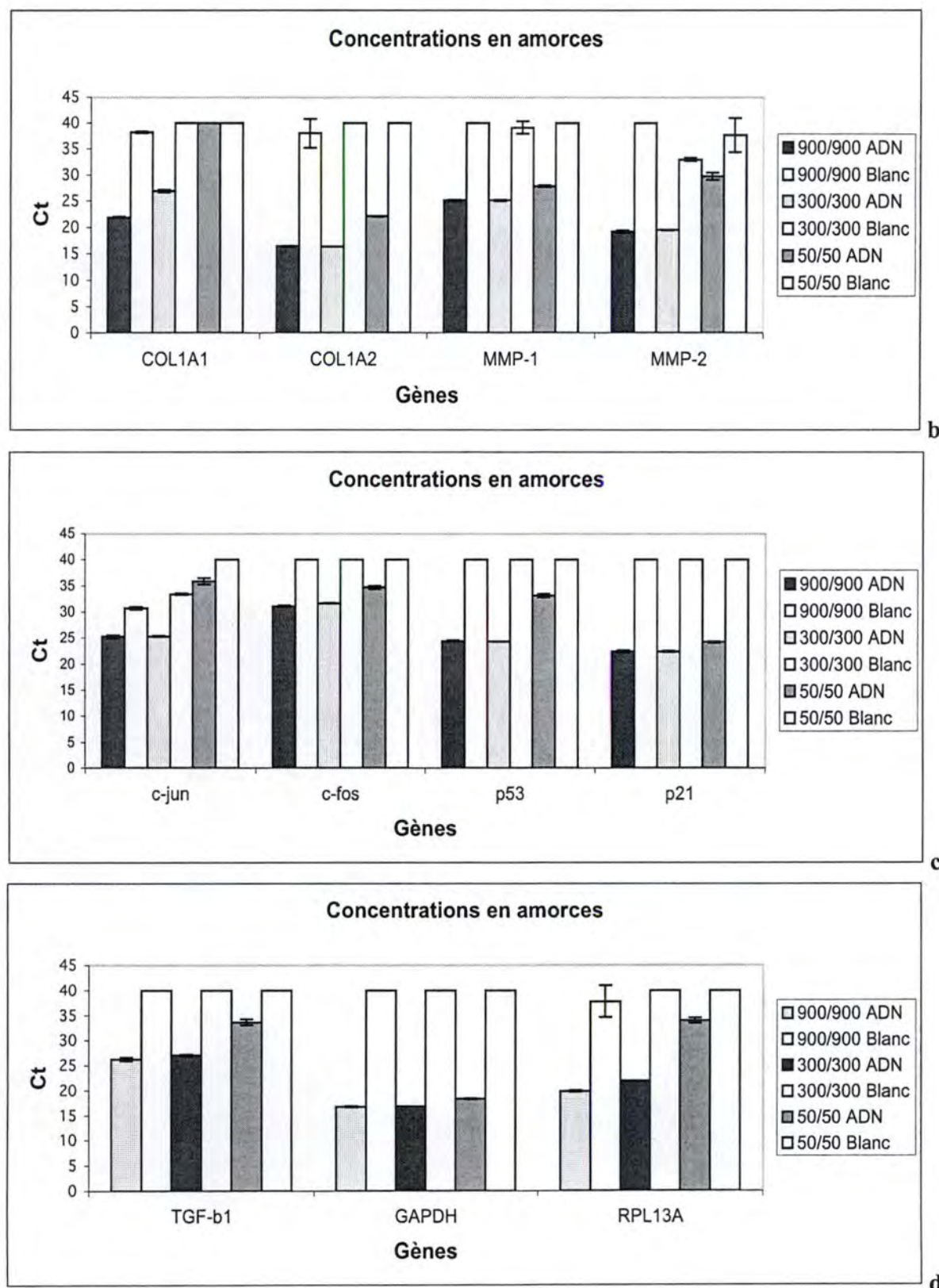


Figure 20 : Détermination des concentrations optimales des couples d'amorces de nos gènes d'intérêts. Trois combinaisons de concentrations en amorces (sens/anti-sens) sont utilisées : 900 nM/900 nM, 300 nM/300 nM, 50 nM/50 nM. La concentration optimale est celle qui permet une forte amplification de l'ADN (Ct faible) sans avoir d'amplification au niveau du blanc (Ct élevé).

Dans le cas du gène *c-jun*, aucune de ces trois combinaisons ne semblait vraiment optimale dès lors, nous avons analysé les neuf combinaisons possibles avec les trois concentrations en amorces (900 nM, 300 nM, 50 nM) de manière à réduire le Ct (Figure 21).

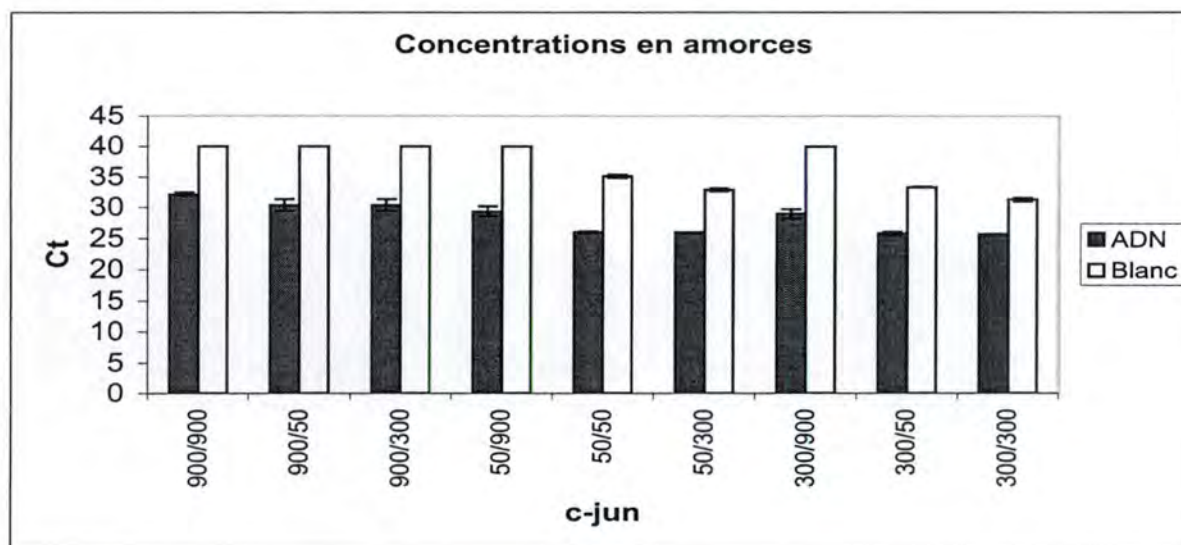


Figure 21 : Détermination de la concentration optimale pour le couple d'amorce du gène *c-jun*. Analyse des 9 combinaisons possibles avec les concentrations en amorces 900 nM, 300 nM et 50 nM afin de réduire le Ct. La concentration optimale est celle qui permet une forte amplification de l'ADN (Ct faible) sans avoir d'amplification au niveau du blanc (Ct élevé).

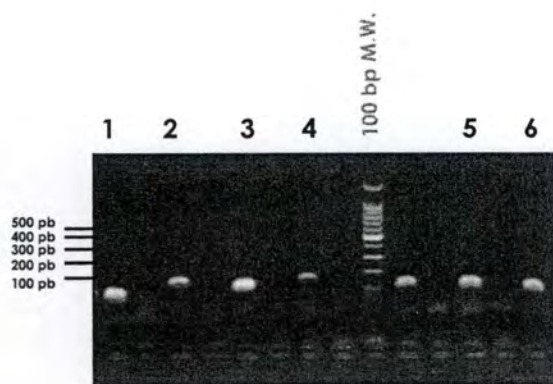
Suite à ces résultats nous avons donc pu déterminer les concentrations optimales en amorces pour les gènes dont nous désirons étudier le niveau d'expression (Tableau 4).

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
apo J	300 nM	300 nM
Fibro	900 nM	900 nM
FN1var2	300 nM	300 nM
Ostéo	300 nM	300 nM
SM22	300 nM	300 nM
COL1A1	300 nM	300 nM
COL1A2	300 nM	300 nM
MMP-1	900 nM	900 nM
MMP-2	900 nM	900 nM
c-jun	300 nM	300 nM
c-fos	300 nM	300 nM
P53	900 nM	900 nM
P21 ^{WAF-1}	300 nM	300 nM
TGF-β1	900 nM	900 nM
GAPDH	300 nM	300 nM
RPL13A	300 nM	300 nM

Tableau 4 : Concentrations optimales déterminées pour chaque couple d'amorces utilisé dans ce travail.

Gènes	Amorces			Amplicon	
	nom	Séquence (sens 5'-3')	Concentration	Taille (pb)	Tm (°C)
apo J	APO J-937F	GGA TGA AGG ACC AGT GTG ACA AG	300	114	84
	APO J-1050R	CAG CGA CCT GGA GGG ATT C	300		
Fibronectine	fibronectine-343F	TGT GGT TGC CTT GCA CGA T	900	109	82
	fibronectine-451R	GCT TGT GGG TGT GAC CTG AGT	900		
FN1 var 2	FN1 var2-19F	AACCTTGGATACTGAGTCTCCT	300	139	73
	FN1 var2-157R	AATTGACCACATATTGTTTGTCTACTAA	300		
Ostéonectine	osteonectine-868F	GAG ACC TGT GAC CTG GAC AAT G	300	115	81
	osteonectine-982R	GGA AGG AGT GGA TTT AGA TCA CAA GA	300		
SM22	SM22-511F	CGT GGA GAT CCC AAC TGG TT	300	96	80
	SM22-606R	AAG GCC AAT GAC ATG CTT TCC	300		
COL1A1	COL1A1-51F	CCC AAG GAC AAG AGG CAT GT	300	62	85
	COL1A1-141R	CAT CGG CAG GGT CGG AG	300		
COL1A2	COL1A2-82F	CAT GCC GTG ACT TGA GAC TCA	300	98	80
	COL1A2-179R	GAT TAC TTT GAT AGC ATC CAT AGT GAC TC	300		
MMP-1	MMP-1-77F	CAT GCG CAC AAA TCC CTT CTA	900	149	78
	MMP-1-225R	GAA CAG CCC AGT ACT TAT TCC CTT T	900		
MMP-2	MMP-2-305F	ATC GAC GAT GCC TGG AAT G	900	116	83
	MMP-2-420R	CTT TGG TTC TCC AGC TTC AGG TAA T	900		
c-jun	jun-215F	GGA TCA AGG CGG AGA GGA A	300	88	84
	jun-302R	TCC AGC CGG GCG ATT	300		
c-fos	FOS-29F	TCA CCC GCA GAC TCC TTC TC	300	95	85
	FOS-123R	GTG GGA ATG AAG TTG GCA CTG	300		
p53	p53-76F	AAG AAA CCA CTG GAT GGA GAA	900	75	81
	p53-150R	CAG CTC TCG GAA CAT CTC GAA	900		
p21 ^{WAF-1}	p21-106F	CTG GAG ACT CTC GAA GTC GAA	300	123	83
	p21-228R	CCA GGA CTG CAG GCT TCC T	300		
TGF- β 1	TGF1-34F	AGG GCT ACC ATG CCA ACT TCT	900	102	84
	TGF1-135R	CCG GGT TAT GCT GGT TGT ACA	900		
GAPDH	GAPDH-43F	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GAC	200	110	82
	GAPDH-153R	GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA	200		
RPL13A	RPL13A-387F	CTC AAG GTC GTG CGT CTG AA	300	94	83
	RPL13A-480R	TGG CTG TCA CTG CCT GGT ACT	300		

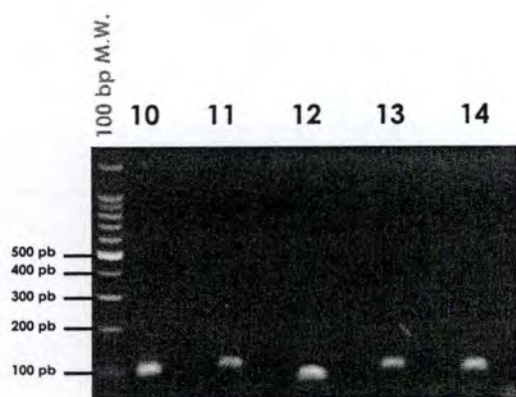
Tableau 5 : Liste des amorces utilisées lors de la Real Time RT-PCR .



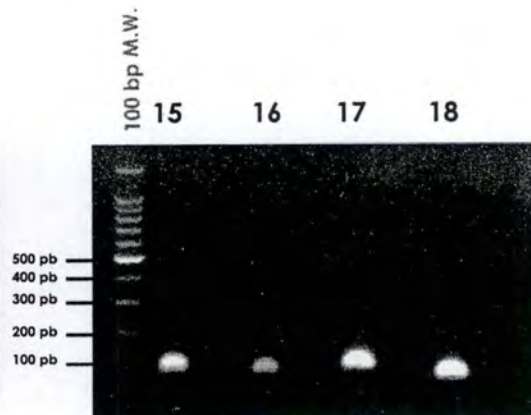
1: COL1A2
2: MMP-1
3: MMP-2
4: MMP-3
5: Fibro
6: Ostéo



7: COL1A1
8: FN1 var 2
9: GAPDH
10: RPL13A



10: RPL13A
11: SM22
12: p53
13: c-jun
14: c-jun



15: apoJ
16: c-fos
17: p21
18: TGF- β 1

Figure 22 : Vérification de la spécificité de la PCR. Nous observons une seule bande correspondant à l'amplicon et aucune contamination dans le blanc de PCR pour chaque gène d'intérêt.

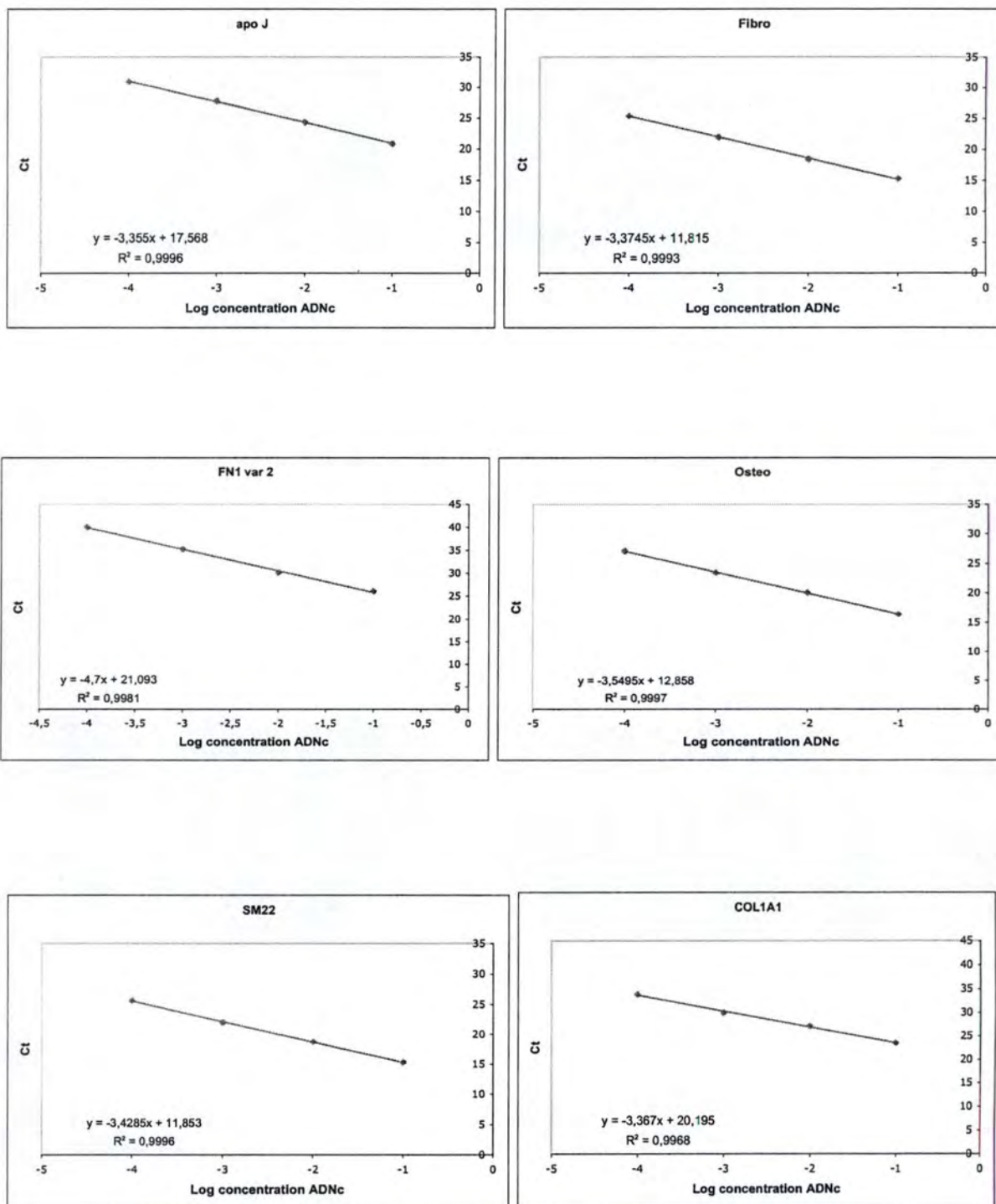


Figure 23 a : Détermination de l'efficacité de la PCR propre à chaque couple d'amorces. Chaque dilution est caractérisée par une amplification dont le Ct est particulier à la concentration en ADNc. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la droite passant par les différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration.

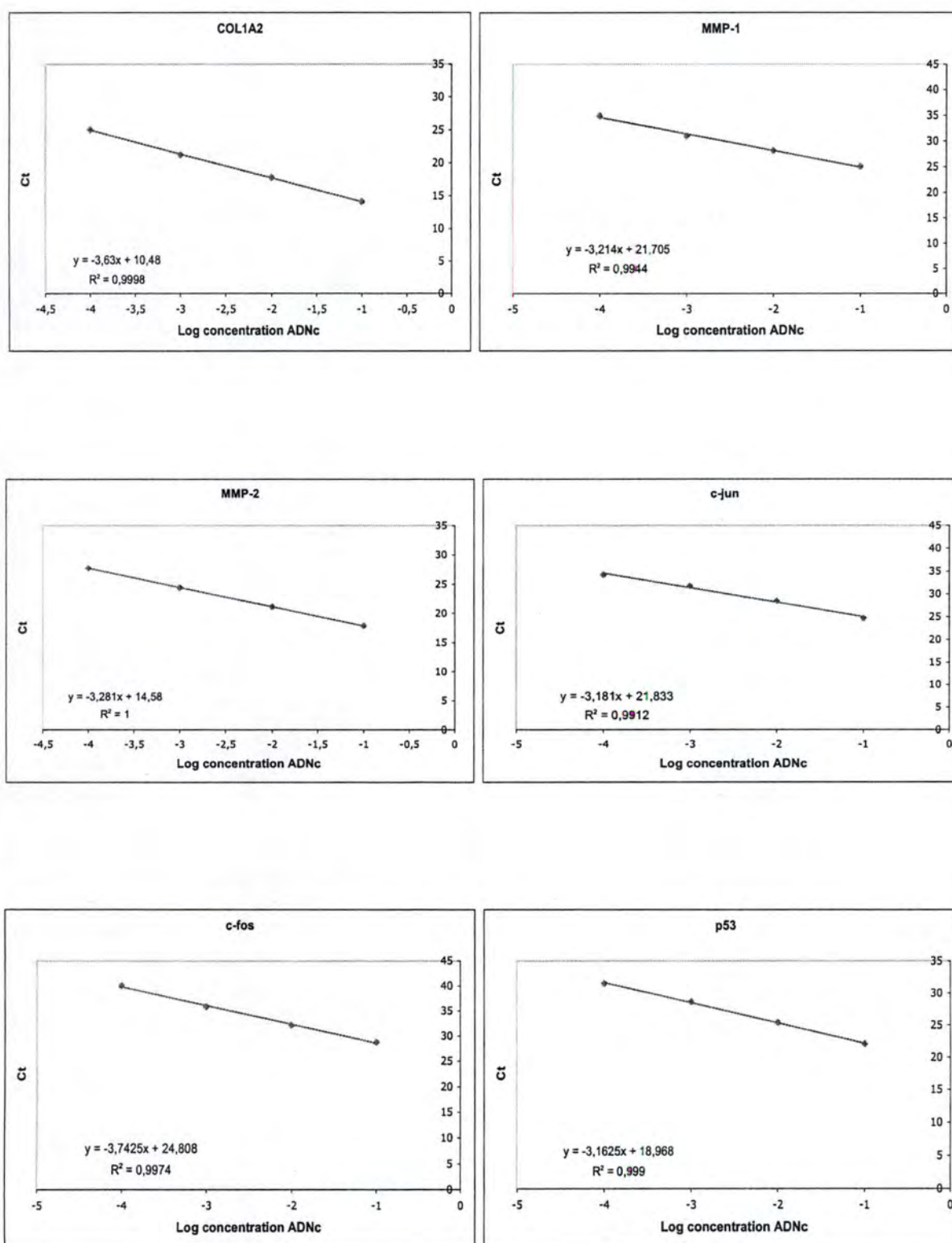


Figure 23 b : Détermination de l'efficacité de la PCR propre à chaque couple d'amorces. Chaque dilution est caractérisée par une amplification dont le Ct est particulier à la concentration en ADNc. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{1/\text{pente}}$ de la droite passant par les différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration.

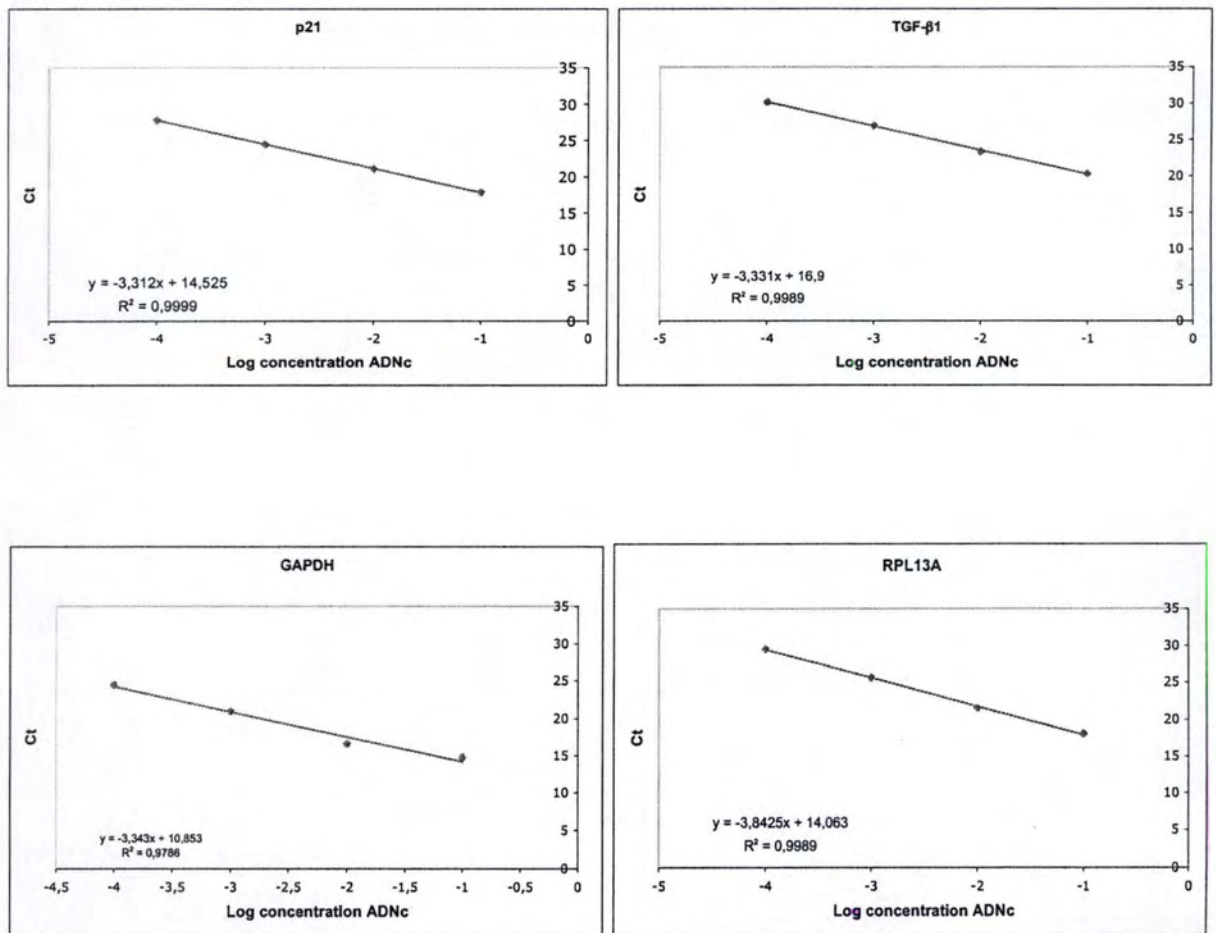


Figure 23 c : Détermination de l'efficacité de la PCR propre à chaque couple d'amorces.

Chaque dilution est caractérisée par une amplification dont le Ct est particulier à la concentration en ADNc. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la droite passant par les différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration.

Deux techniques sont utilisées pour vérifier la spécificité de la PCR.

La première consiste à réaliser une courbe de dissociation juste après la PCR en augmentant progressivement la température de 60 °C à 95 °C ce qui dénature les brins d'ADN et libère la molécule fluorescente : le SYBR GREEN. On a donc une chute de la fluorescence que nous observons sous sa forme dérivée. A chaque libération de SYBR GREEN on voit un pic de dissociation à une température de melting (ou T_m) spécifique dépendant de la taille et de la composition des brins d'ADN de l'amplicon. Cette T_m représente la température où 50 % des brins d'ADN sont dénaturés. On compare les T_m expérimentales aux T_m attendues afin de vérifier que l'amplicon est spécifique du gène que l'on veut amplifier. Cette méthode nous permet également de voir s'il y a contamination des échantillons (plusieurs pics) et également de détecter des dimères d'amorces (Tableau 5).

La deuxième technique consiste en la migration sur gel d'agarose de nos produits PCR. Cette électrophorèse nous permet de vérifier la spécificité de notre PCR, de vérifier si la taille de l'amplicon obtenue est bien celle attendue et enfin de détecter s'il n'y a pas eu de contamination dans les blancs PCR. Les différents gels sont repris à la figure 22. Nous observons pour tous nos gènes une seule bande correspondant à l'amplicon à la taille attendue ainsi qu'aucune contamination dans les blancs PCR.

Ces différents tests nous ont permis de déterminer une concentration optimale en amorces pour laquelle une amplification spécifique était détectée.

Enfin, nous réalisons une PCR avec les amorces à la concentration optimale sur une série d'échantillons d'ADN dilué de 10 à 10 000 fois afin de déterminer l'efficacité de la PCR pour le couple d'amorces donné. Chaque dilution sera caractérisée par une amplification dont le Ct sera particulier à la concentration en ADNc. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la droite passant par les différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration (Figures 23 a, b et c). Cette efficacité, propre à chaque couple d'amorces est indispensable pour la quantification du niveau d'ARNm.

Gènes	Pente	Efficacité
apo J	-3,355	1,99
Fibro	-3,3745	1,98
FN1 var 2	-4,7	1,63
Osteo	-3,5495	1,91
SM22	-3,4285	1,96
COL1A1	-3,367	1,98
COL1A2	-3,63	1,89
c-fos	-3,7425	1,85
c-jun	-3,181	2,06
MMP-1	-3,214	2,05
MMP-2	-3,281	2,02
p21 ^{WAF-1}	-3,312	2,00
p53	-3,1625	2,07
TGF-β1	-3,331	2,00
GAPDH	-3,343	1,99
RPL13A	-3,8425	1,82

Tableau 6 : Une courbe standard est réalisée pour chaque gène à partir des différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la courbe standard. Ce tableau reprend la pente et l'efficacité propre à chaque gène.

Ces différentes mises au point réalisées, nous pouvons étudier l'expression des gènes d'intérêts cités ci-dessus et ce dans nos conditions expérimentales.

Lors de cette étude nous avons comparé les niveaux relatifs d'ARNm de nos gènes d'intérêts issus des cellules soumises aux UVB par rapport aux cellules CTL (Figure 24), et les niveaux relatifs d'ARNm de cellules jeunes par rapport aux cellules sénescences (Figure 25). Ceci nous permet de comparer l'effet de la SIPS aux UVB sur l'expression des gènes d'intérêts par rapport à l'effet de la sénescence répllicative.

□ CTL
■ UVB

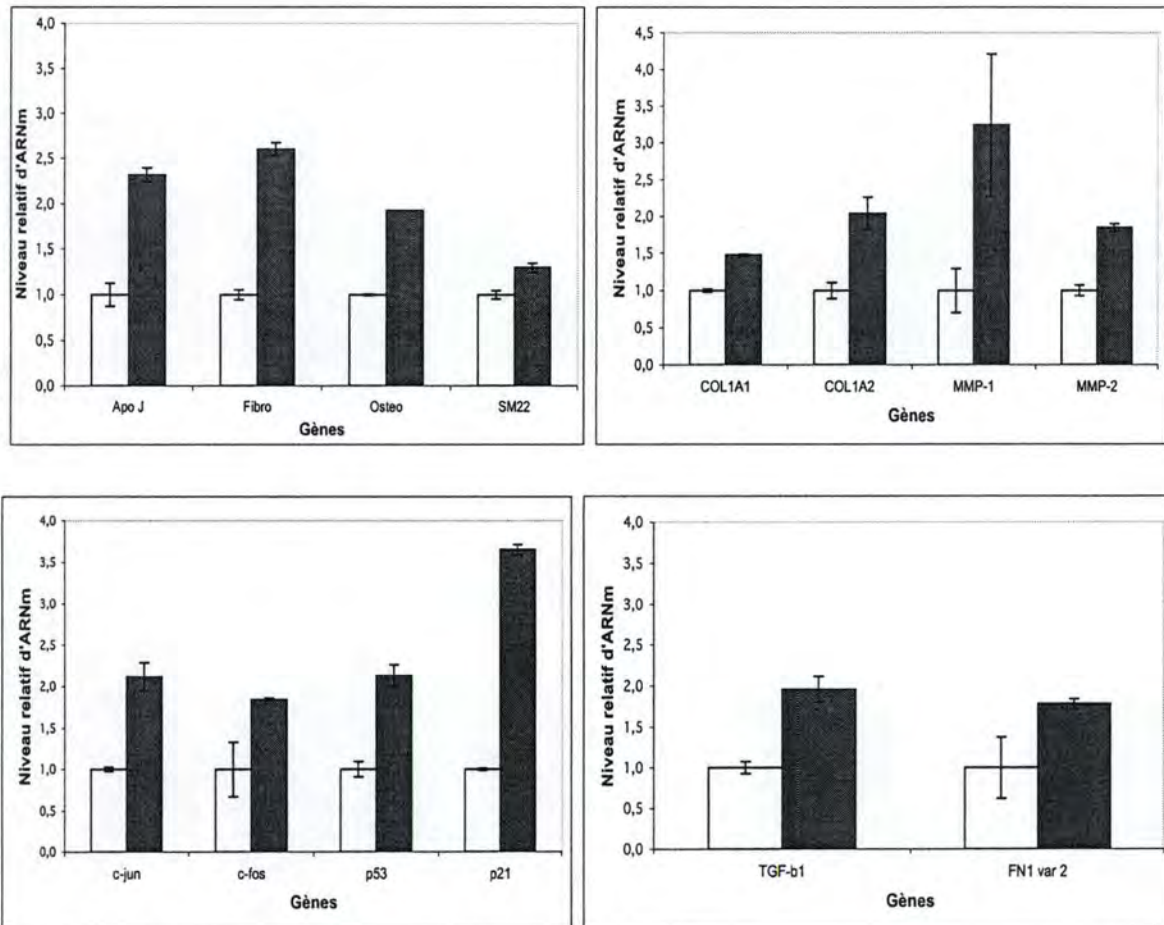


Figure 24 : Etude du niveau relatif d'ARNm de nos gènes d'intérêts par Real Time RT-PCR. Nous avons analysé l'expression des gènes dans des FDHs jeunes (DCP 27-29) ayant subi les mêmes conditions de cultures que les cellules soumises aux UVB et servant de contrôle (CTL) ainsi que dans les FDHs jeunes (DCP 27-29) soumis aux stress (UVB). On normalise les résultats via l'expression d'un gène de référence (ici GAPDH) et on rapporte le niveau d'ARNm des cellules stressées à celui des cellules CTL.

Les résultats obtenus montrent que les gènes apo J, fibronectine, ostéonectine et SM22 connus pour être surexprimés lors de la sénescence montrent également un niveau d'ARNm augmenté dans la SIPS induite par les UVB (Gonos et al., 1998).

Les gènes de la matrice extra cellulaire tels que MMP-1 et MMP-2 dont l'expression augmente dans une peau vieillissante (Rittie and Fisher, 2002) montrent aussi une élévation de leur niveau relatif d'ARNm dans les cellules stressées aux UVB par rapport aux cellules CTL. Cette augmentation peut être liée à la surexpression des gènes codant pour les sous-unités c-fos et c-jun composant le facteur de transcription AP-1 qui régule l'expression des métalloprotéinases.

Nous constatons aussi que les inhibiteurs du cycle cellulaire p53 et p21^{WAF-1} ont un niveau d'ARNm qui augmente dans les cellules stressées aux UVB. Cela pourrait expliquer l'augmentation, observée par Western Blot, de ces protéines dans la cellule ainsi que la diminution de la capacité de prolifération estimée par le test d'incorporation de la [³H]-thymidine.

Enfin, nous remarquons que nous avons une augmentation du niveau relatif d'ARNm pour le TGF- β 1 dans nos cellules stressées. Celui-ci pourrait donc jouer un rôle dans l'apparition prématurée de la sénescence induite par les UVB.

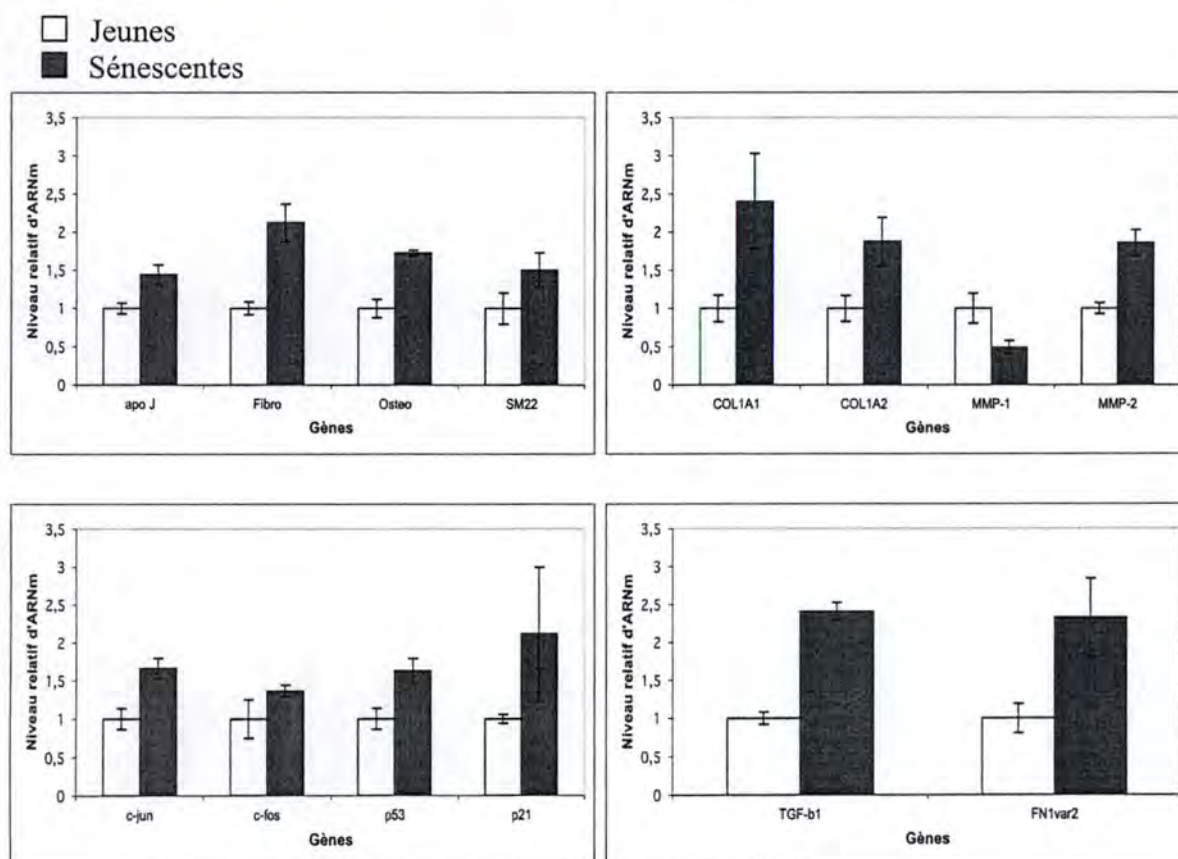


Figure 25 : Etude du niveau relatif d'ARNm de nos gènes d'intérêts par Real Time RT-PCR. Nous avons analysé l'expression des gènes chez des FDHs jeunes (DCP 27-29) et chez des FDHs sénescentes (DCP 40). On normalise les résultats via un gène de référence (ici GAPDH) et on rapporte le niveau d'ARNm des cellules sénescentes à celui des cellules jeunes.

Ensuite, nous avons analysé les niveaux relatifs d'ARNm de nos gènes d'intérêts chez les fibroblastes sénescents.

Nous observons une surexpression des gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence (apo J, fibronectine, ostéonectine et SM22) en plus de la SA β -gal et de l'arrêt prolifératif.

Au niveau des métalloprotéinases nous remarquons une diminution du niveau d'expression de la MMP-1 et une augmentation pour MMP-2. On peut supposer que la surexpression des MMP ne se fait pas simultanément en sénescence répliquative et que donc on n'observe pas d'augmentation dans le niveau d'expression des gènes pour toute les MMP exprimables dans ce type cellulaire. Le fait qu'une augmentation du niveau relatif d'ARNm de la MMP-1 soit observée en SIPS peut être dû aux effets causés par les UVB via l'activation simultanée de différents mécanismes cellulaires.

Nous constatons également une augmentation du niveau d'ARNm des gènes c-fos et c-jun (permettant la formation de AP-1) et une augmentation des niveaux relatifs d'ARNm des gènes codant pour p53 et p21^{WAF-1} inhibant le cycle cellulaire.

Et puis, nous observons une augmentation du niveau d'ARNm du TGF- β 1. On peut également se poser la question du rôle du TGF- β 1 dans l'apparition de la sénescence prématurée due aux UVB.

Le détail des niveaux relatifs d'ARNm pour les gènes d'intérêts est exposé dans le tableau suivant :

Gènes	Niveau d'ARN cellules SIPS UVB (SIPS/CTL)	Niveau d'ARN cellules Sénescences (Sénescences/jeunes)	Rapport SIPS/Sénescence
apo J	2,3	1,4	1,6
Fibro	2,6	2,1	1,2
FN1 var2	1,8	2,3	0,8
Ostéo	1,9	1,7	1,1
SM22	1,3	1,5	0,9
COL1A1	1,5	2,4	0,6
COL1A2	2	1,9	1,1
MMP-1	3,2	0,5	6,4
MMP-2	1,9	1,9	1,0
c-jun	2,1	1,7	1,2
c-fos	1,8	1,4	1,3
p53	2,1	1,6	1,3
p21 ^{WAF-1}	3,7	2,1	1,8
TGF- β 1	2	2,4	0,8

Tableau 7 : Analyse des niveaux relatifs d'ARNm de nos gènes d'intérêts dans notre modèle de SIPS et en sénescence répliquative. Rapport SIPS/Sénescence entre 0,7 et 1,3 : Fibro, FN1 var2, Ostéo, SM22, COL1A2, MMP-2, c-jun, c-fos, p53 et TGF- β 1. Rapport $\leq 0,7$ ou $> 1,3$: apo J, COL1A1, MMP-1 et p21^{WAF-1}. Seul COL1A1 $< 0,7$.

Nous remarquons que 10 gènes sur les 14 étudiés ont un niveau d'ARNm relatif semblable en sénescence réplivative et en SIPS induite par les UVB avec des valeurs seuil de rapport entre 0,7 et 1,3 fois. Trois autres gènes montrent des rapports supérieurs en SIPS par rapport à la sénescence réplivative. Seul COL1A1 évolue dans un sens différent.

4) Hybridation sur damier à ADN : SeneChips

Les résultats obtenus, suite à l'hybridation d'ADNc synthétisé à partir d'ARNm provenant de FDHs jeunes (DCP 27-29) ayant suivi les mêmes conditions de culture que les cellules stressées ainsi que de FDHs jeunes (DCP 27-29) soumis à la SIPS aux UVB sur la SeneChips, nous ont fourni beaucoup d'informations. Afin de pouvoir les analyser, nous avons classé les gènes pour lesquels nous avons une modification significative du niveau relatif d'expression suivant leurs fonctions. La visualisation d'une lame scannée est reprise en annexe.

Matrice extra cellulaire

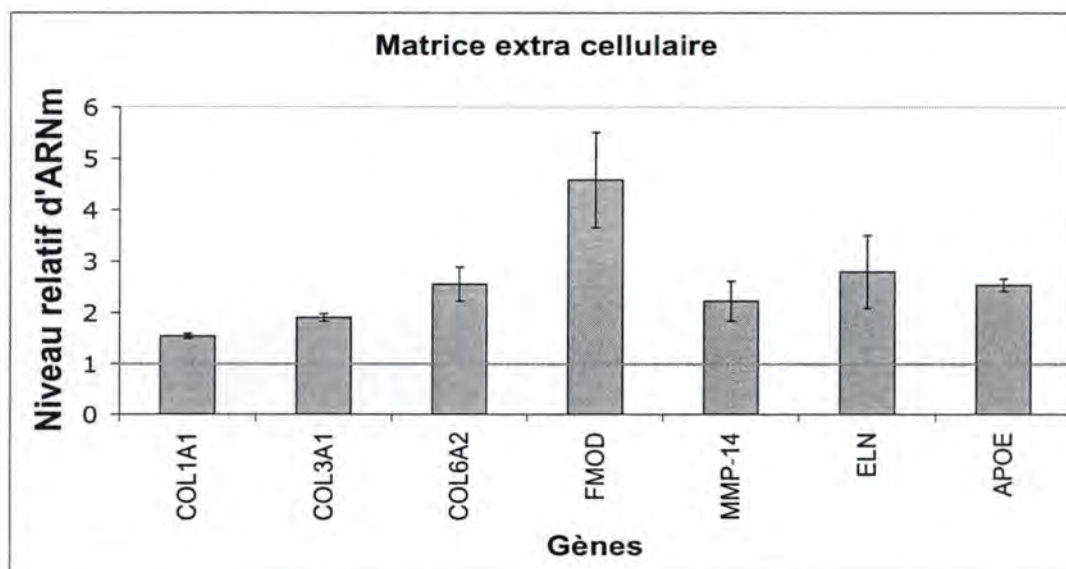


Figure 26 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle dans la matrice extra cellulaire chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Comme nous l'avons déjà dit auparavant, de nombreux gènes de la MEC voient leur niveau d'expression modifié lors de la sénescence réplivative. Dans notre étude, on retrouve une surexpression de l' α -1 procollagène de type I (COL1A1), de l' α -1 procollagène de type III (COL3A1) et de l' α -2 procollagène de type VI (COL6A2). COL1A1 et COL3A1 ont déjà été décrits dans plusieurs études comme étant surexprimés en sénescence réplivative (Choi et al., 1992) et (Gonos et al., 1998). La fibromoduline (FMOD) est capable de se lier au collagène de type I et II et intervient dans l'assemblage des fibres de collagène. De plus, on remarque une surexpression de l'élastine. Tous ces résultats semblent nous montrer qu'il y a des modifications de la constitution de la MEC suite aux stress répétés aux UVB, tout comme c'est le cas en sénescence réplivative.

Outre ces gènes codant pour des constituants de la MEC, le gène codant pour la métalloprotéinase 14 (MMP-14) voit également son niveau d'expression augmenter suite aux stress. MMP-14 dégrade la fibrilline. Les MMP sont connues pour être surexprimées en sénescence répliquative (pour une revue (Campisi, 1999)). Si ces résultats sont confirmés au niveau protéique et activité biochimique, ils pourraient suggérer une profonde modification de la MEC, comparable en partie à ce qui est observé en sénescence répliquative et lors du vieillissement *in vivo*.

Réponse aux stress et réparation de l'ADN.

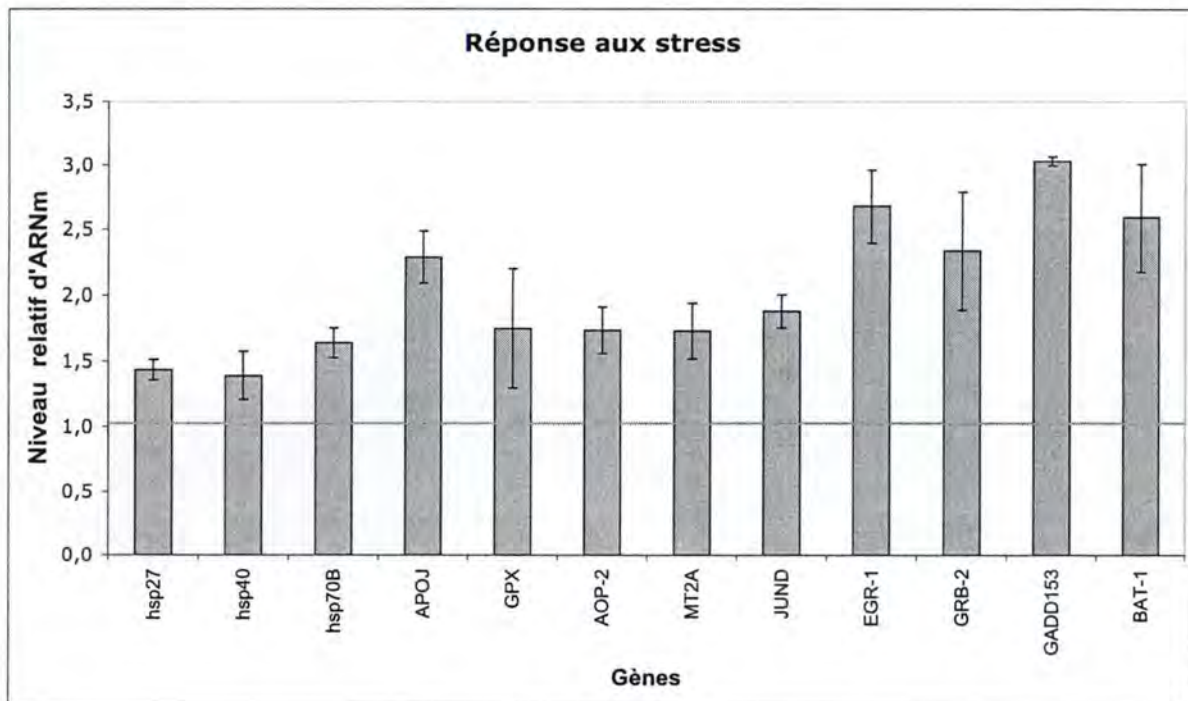


Figure 27 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle dans la réponse au stress chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Il n'est pas étonnant de constater que de nombreux gènes de réponse aux stress voient leur niveau d'ARNm augmenter après les stress aux UVB. Toutefois, il est intéressant de noter que cette augmentation est toujours présente 72 h après le dernier stress.

Parmi ces gènes, on retrouve trois gènes de la famille des « heat shock protein » (hsp) : hsp27, hsp 40 et hsp 70B. Les hsp sont principalement connues pour aider au repliement des protéines après stress. Hsp 27 jouerait en plus un rôle en tant que modulateur de la polymérisation de l'actine (Huot et al., 1998), ce qui pourrait expliquer en partie les changements morphologiques observés après les stress aux UVB et en sénescence répliquative.

L'apolipoprotéine J (apo J), décrite comme une chaperonne sécrétée voit également son expression surexprimée suite aux stress. Ce gène est connu pour être surexprimé lors de la sénescence répliquative (Gonos et al., 1998) et pour avoir un rôle protecteur face aux stress et à la SIPS (Dumont et al., 2002).

On retrouve également trois gènes codant pour des protéines anti-oxydantes : la glutathion peroxidase (GPX), la protéine anti-oxydante 2 (AOP-2) et la métallothionéine 2A (MT2A).

Deux gènes favorisant la survie, EGR-1 et Grb2, sont aussi surexprimés dans nos conditions.

Enfin, deux gènes intervenant dans le processus de réparations à l'ADN sont surexprimés : GADD135 et BAT-1. GADD153 semble être un gène particulièrement surexprimé en réponse aux stress UV (Gujuluva et al., 1994).

Cycle cellulaire

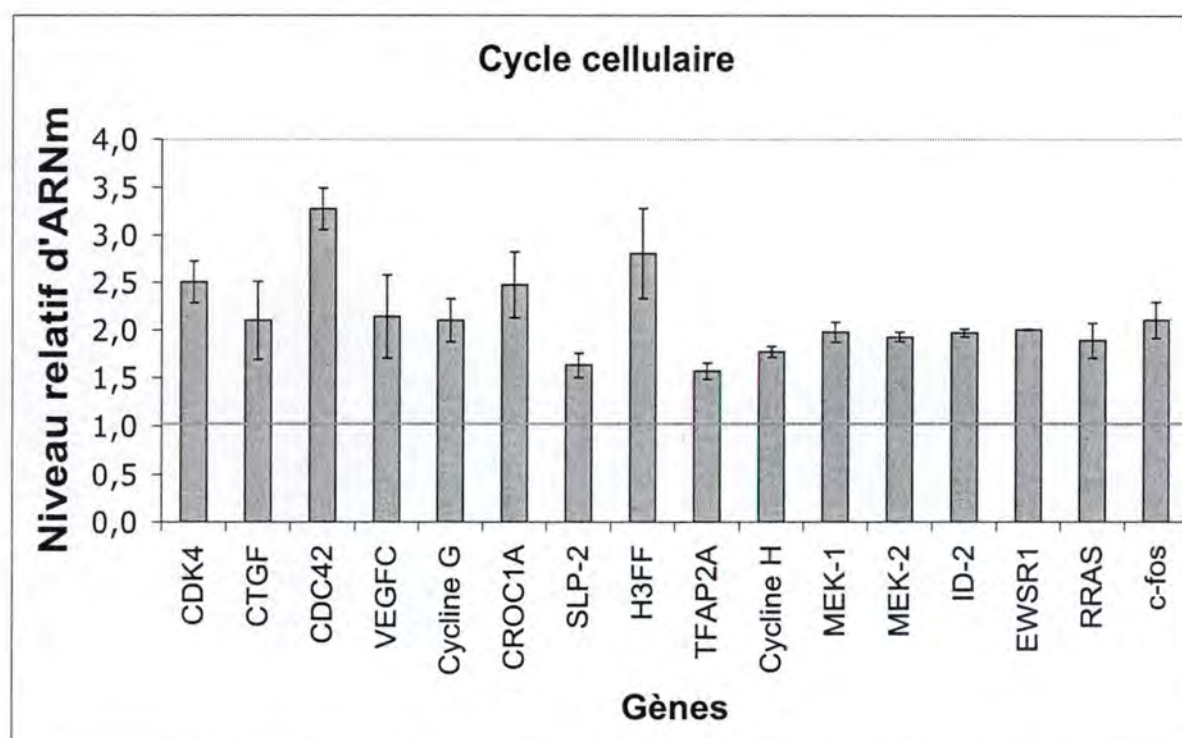


Figure 28 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle dans le cycle cellulaire chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Beaucoup de gènes impliqués dans le cycle cellulaire voient leur expression augmenter suite aux stress UVB. Parmi tous ces gènes, quelques-uns ont particulièrement retenus notre attention.

Tout d'abord, on observe une surexpression de R-ras. Ce gène est décrit comme pouvant engendrer la sénescence répliquative lorsqu'il est surexprimé (Serrano et al., 1997). Un des mécanismes proposés serait une activation de la voie des MAPK via MEK1/MEK2 (Wang et al., 2002) qui activeraient p38 MAPK qui elle-même interviendrait, par un mécanisme non encore élucidé, dans la surexpression de p53 et des CDKIs p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} ce qui engendrerait un arrêt du cycle cellulaire.

La cycline G est décrite comme un gène cible de p53 (Okamoto et al., 2002) et celle-ci permettrait le recrutement de la phosphatase PP2A qui réagirait avec Mdm2 et empêcherait son action sur p53 induisant donc une boucle de rétro-action positive de p53.

Enfin, c-fos voit de façon assez surprenante, son niveau d'ARNm augmenter ainsi que le gène de CROCI1A, transactivateur de c-fos, alors que son expression a été plusieurs fois décrite comme étant sous-exprimée en sénescence réplivative (Seshadri and Campisi, 1990).

Toutefois, plusieurs études ont montré que les UV induisaient une surexpression du facteur de transcription AP-1 qui régulerait alors l'expression des métalloprotéinases ce qui provoquerait une dégradation de la MEC observé sur de la peau sénescence *in vivo* (Rittie and Fisher, 2002).

CDC42 code pour une petite protéine G de la famille Rho. Cette CDC42 peut se lier à PAK (kinase activée par p21) et stimule la réorganisation de l'actine (Vidal et al., 2002), qui pourrait de nouveau expliquer en partie les changements morphologiques observés en SIPS et en sénescence réplivative si ceci se vérifiait au niveau protéique.

Le facteur de croissance du tissu conjonctif (CTGF) est une protéine riche en cystéines qui est induite par le TGF- β 1. Cette induction du CTGF par le TGF- β 1 pourrait être un mécanisme menant à la surexpression du niveau d'ARNm de la fibronectine, du collagène de type I et III (Chen et al., 2000).

Métabolisme énergétique

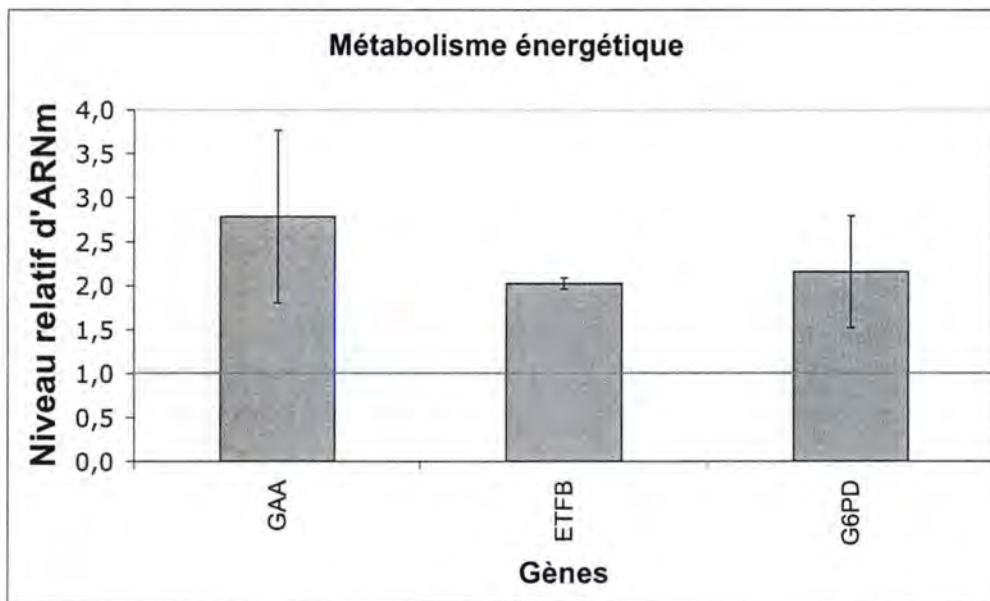


Figure 29 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle dans le métabolisme énergétique chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Tout d'abord, on retrouve le précurseur II de la glucosidase (GAA) qui joue un rôle au niveau de la glycolyse et la sous-unité β de la flavoprotéine de transfert d'électron (ETFB), dans cette catégorie. Les protéines respectives correspondant à ces deux gènes ont été mises en évidence lors d'une étude protéomique réalisée dans notre laboratoire. Leur niveau protéique augmente en SIPS induite par le *t*-BHP et en sénescence répliquative (Dierick et al., 2002b). Il est intéressant de constater que dans notre modèle, les deux gènes sont également surexprimés.

Enfin, le gène codant pour la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) a également été mis en évidence comme montrant une augmentation de son niveau d'ARNm. Ce gène code pour une enzyme régulatrice de la voie des pentose-phosphates et engendre une production de NADPH. Il est intéressant de noter que le NADPH produit lors de cette étape peut être à son tour utilisé par la glutathion reductase réduisant le glutathion oxydé par la GPX. Ceci va donc dans le sens d'une défense anti-oxydante accrue après la SIPS aux UVB.

Cytokine et récepteur

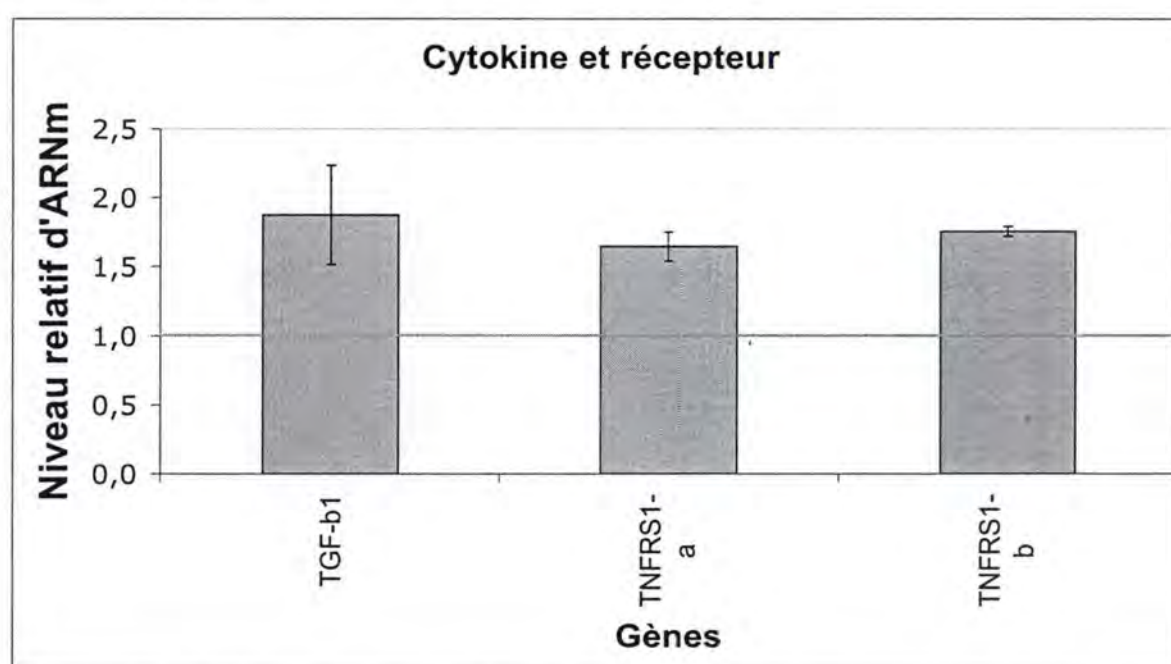


Figure 30 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle de cytokine chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Le niveau d'ARNm du TGF- β 1 augmente après les stress aux UVB, ce qui confirme des résultats déjà obtenu par notre équipe dans l'étude de la SIPS induite par les UVB (Chainiaux et al., 2002b). Le rôle du TGF- β 1 dans le développement de la SIPS induite par l' H_2O_2 a déjà été décrit précédemment dans ce mémoire (Fripiat et al., 2001). Il serait intéressant d'étudier si celui-ci joue également un rôle dans l'établissement de la SIPS induite par les UVB.

Les gènes codant pour les récepteurs α et β du TNF- α (TNFRS1- α et TNFRS1- β) sont également surexprimés suite aux stress aux UVB. Le TNF- α a déjà été mis en évidence comme facteur pouvant enclencher la SIPS (Dumont et al., 2000a) et la transactivation du signal résultant de celui-ci pourrait également être du plus grand intérêt dans le cadre de notre modèle.

Notons qu'il a déjà été montré que les UVB induisaient la surexpression du TNF- α qui pourrait être impliqué dans les dommages à l'épiderme causé en réponse aux irradiations solaire intense (Dy et al., 1999).

Divers

- Facteur de croissance
- Organisation des chromosomes
- Différenciation

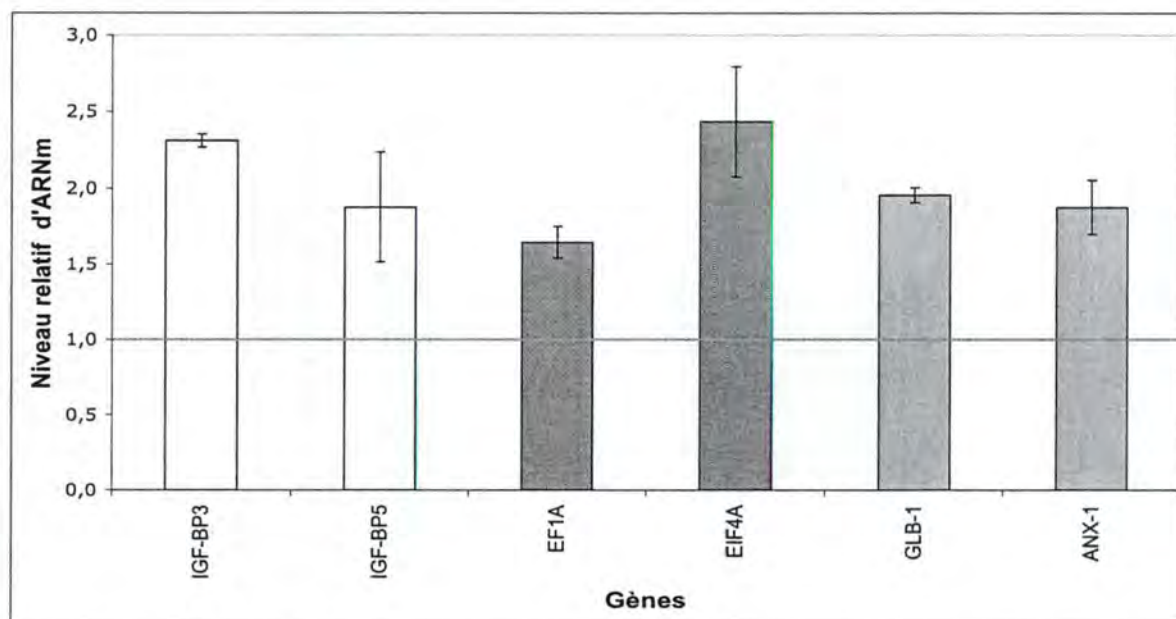


Figure 31 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle de différenciation, de facteur de croissance ou dans l'organisation des chromosomes chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Parmi les autres gènes qui sont également surexprimés, nous retrouvons les gènes codant pour les protéines de liaison à l'IGF 3 et 5 (IGFBP3 et IGFBP 5). IGFBP 3 a déjà été décrit comme étant surexprimé dans des FDHs sénescents (Grigoriev et al., 1995) celui-ci pourrait se lier à IGF et le séquestrer ce qui induirait une réponse atténuée des FDHs sénescents à l'IGF-1.

Les gènes EF1A (eukaryotic translation elongation factor 1) et EIF4A (eukaryotic translation initiation factor 4) sont également surexprimés et interviennent tous les deux dans la traduction.

Il est intéressant de constater que le gène codant pour la β -galactosidase (GLB-1) voit son expression augmenter d'un facteur 2 après les stress aux UVB. Ceci pourrait tout à fait être mis en relation avec la proportion de cellules positives à la SA β -gal suite à la SIPS aux UVB puisque la β -gal et la SA β -gal sont issues de ce même gène (Kurz et al., 2000).

- ☐ Protéasome
- ☒ Inflammation
- ☒ Apoptose

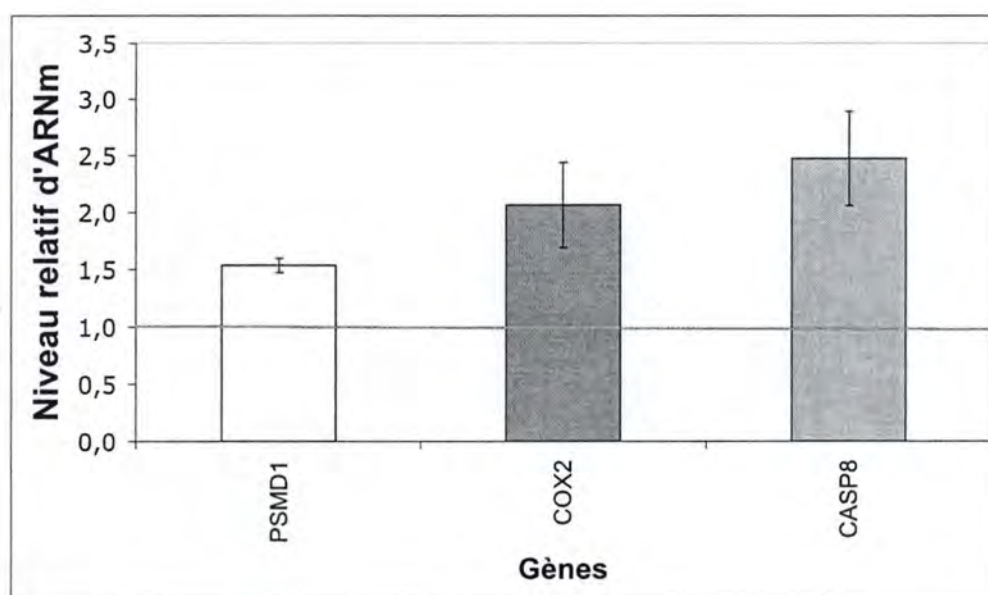


Figure 32 : Analyse via SeneChips du niveau d'ARN de gènes jouant un rôle dans le protéasome, dans l'inflammation ou dans l'apoptose chez des FDHS soumis aux UVB. Les résultats ont été normalisés par des standards internes et des « house keeping gene » et un ratio est calculé entre les cellules stressées et les cellules CTL qui n'ont pas subi de stress sous UVB mais qui ont été soumises aux mêmes conditions de culture.

Enfin, le gène codant pour la cyclooxygénase (COX2) voit également son niveau d'ARNm surexprimer après les stress, ce qui démontrerait un état pro-inflammatoire qui a déjà été démontrée dans l'inflammation induite par les UVB (Chen et al., 2001).

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude menée lors de ce mémoire avait comme premier but de valider un modèle de sénescence induite prématurément par une série de dix stress aux UVB. Une fois ceci terminé, une analyse plus générale du mécanisme induisant la SIPS a été effectuée au niveau transcriptomique à l'aide du damier à ADN à basse densité, la SeneChips.

Afin d'obtenir un modèle de SIPS aux UVB où une apparition plus marquée des biomarqueurs de la sénescence par rapport à celui qui avait déjà été mis au point précédemment (Chainiaux et al., 2002a), nous avons développé ce modèle à dix stress et comparé l'analyse des caractéristiques de la sénescence obtenues chez nos FDHs de peau jeunes soumis aux stress à celles retrouvées dans des FDHs de peau sénescents. Ceci nous permettait de mieux observer les similitudes ou les différences existants entre ces deux phénotypes.

Les résultats obtenus ont montré que la proportion de cellules exposant une activité β -galactosidase associée à la sénescence chez les fibroblastes soumis aux stress est comparable à ce que l'on voit en sénescence répllicative. De plus, une surexpression du niveau d'ARNm de la β -galactosidase 1 est observée dans les FDHs ayant subi la SIPS aux UVB.

En ce qui concerne la capacité de prolifération des FDHs soumis aux stress, nous avons réalisé deux tests. Premièrement, l'incorporation de [3 H]-thymidine lors de la réplication de l'ADN montre que les FDHs sénescents et soumis aux stress ont une faible capacité de prolifération par rapport aux cellules jeunes non soumises aux UVB. On remarque même une diminution plus marquée au niveau des FDHs en SIPS. Deuxièmement l'analyse protéique par Western Blot d'inhibiteurs du cycle cellulaire comme p53, p21^{WAF-1} et p16^{INK4a} permet de constater un niveau protéique plus élevé dans les FDHs soumis aux stress par rapport aux cellules n'ayant pas subi la SIPS. Ces résultats accompagnés de l'analyse de l'augmentation du niveau relatif d'ARNm de p53 et p21^{WAF-1} par Real Time RT-PCR nous permettent de suggérer que les stress aux UVB induisent l'arrêt du cycle cellulaire à long terme, caractéristique importante de la sénescence répllicative, via le gène suppresseur de tumeur p53 et les CDKI p21^{WAF-1} et p16^{INK4a}.

Nous avons également étudié le niveau relatif d'ARNm de gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence (apo J, fibronectine, ostéonectine et SM22) afin de voir ce qu'il en était dans notre modèle et nous avons observé une surexpression de ces quatre gènes en Real Time RT-PCR dans les FDHs ayant subi les stress aux UVB.

Nous avons aussi remarqué une augmentation du niveau relatif d'ARNm des gènes codant pour les protéines c-fos et c-jun dans les cellules sénescents et les cellules stressées. Ces protéines forment le facteur de transcription AP-1 qui pourrait induire entre autres l'expression des gènes codant pour des métalloprotéinases tels que MMP-1 et MMP-2 que nous avons étudié ici et dont le niveau relatif d'ARNm augmente également après les stress aux UVB (Rittie and Fisher, 2002). Une étude au niveau protéique de la quantité de AP-1 formé présent au sein de la cellule et la confirmation du rôle de AP-1 sur l'expression des MMPs déterminerait la corrélation pouvant exister entre la surexpression des gènes c-fos et c-jun et celle des MMPs observée chez les FDHs soumis aux UVB.

Suite à ces résultats nous pouvons conclure que notre modèle de dix stress aux UVB induit une sénescence prématurée dans les fibroblastes de peau *in vitro*. Dans notre étude nous avons comparé l'apparition des biomarqueurs de la sénescence chez nos FDHs soumis aux stress par rapport à ceux existants au niveau de FDHs sénescents *in vitro*.

Nous avons pu voir par Real Time RT-PCR et dernier SeneChips à ADN à basse densité qu'un certain nombre de gènes de réponse aux stress ont un niveau d'ARNm qui augmente dans les FDHs soumis à la SIPS.

Tout d'abord, on retrouve trois membres de la famille des hsp (hsp 27, hsp 40 et hsp 70B) bien connues par le rôle de chaperonne aidant au repliement des protéines suite à un stress cellulaire. Nous constatons également qu'une surexpression du niveau d'ARNm de l'apolipoprotéine J est confirmée par cette technique. Ceci permet de se poser la question du rôle protecteur de l'apo J dans notre modèle. Effet, une étude menée dans notre laboratoire a permis de constater un rôle protecteur de l'apo J contre l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après des stress subcytotoxiques au t-BHP et à l'EtOH chez des fibroblastes de poumons WI-38 (Dumont et al., 2002).

Ensuite, nous observons une augmentation du niveau d'ARNm de la MMP-14 qui peut être corrélée à l'augmentation du niveau relatif d'ARNm des MMP-1 et MMP-2 observé par Real Time RT-PCR et peut expliquer la dégradation de la MEC en sénescence. Plus surprenante, l'augmentation du niveau relatif d'ARNm observée pour COL1A1 et COL1A2 aussi bien dans les FDHs stressés aux UVB que chez les FDHs sénescents. En effet, dans une peau vieillissante on remarque surtout une diminution de la production des protéines constituant la matrice extra cellulaire et une augmentation de la quantité de protéines dégradant la MEC comme MMP-1 et MMP-2. Des études du niveau protéique et de l'activité des MMPs seraient intéressantes. Cette surexpression pourrait être due au TGF- β 1. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le TGF- β 1 serait impliqué dans l'apparition prématurée de la sénescence suite aux stress or nous observons une augmentation de son niveau d'ARNm. Une explication possible pourrait impliquer le TGF- β 1 car celui-ci peut induire la surexpression du CTGF qui à son tour induirait la surexpression des gènes codant pour la fibronectine et le collagène de type I (Rittie and Fisher, 2002). Une étude plus approfondie tant au niveau protéique qu'au niveau transcriptionnel du TGF- β 1 chez les fibroblastes en SIPS induite par les UVB ainsi que son action sur le CTGF serait donc intéressante.

Des résultats préliminaires ont déjà montré que lorsqu'on stimule les FDHs de peau avec du TGF- β 1, on observait un changement de la morphologie, une augmentation de l'activité SA β -gal ainsi que la surexpression du niveau d'ARNm de la fibronectine, de l'ostéonectine et de l'apo J (résultats non publiés). Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Fripiat et al. Travaillant avec des FDHs de poumon (Fripiat et al., 2001). Nous souhaiterions maintenant aller plus loin dans cette analyse en utilisant des anticorps neutralisant le TGF- β 1 ou son récepteur de type II pendant et après exposition des fibroblastes de peau à dix stress sous UVB.

D'autre part, nous remarquons que le gène codant pour GAA, protéine ayant un rôle dans le métabolisme énergétique voit son niveau d'ARNm augmenter. Or, il se trouve qu'une augmentation de niveau de la protéine GAA a été mise en évidence par l'étude protéomique menée par Dierick dans le modèle de SIPS induite par le *t*-BHP ainsi qu'en sénescence répliquative (Dierick et al., 2002b). Il serait intéressant de voir s'il y a aussi une augmentation protéique dans notre modèle car cette enzyme est impliquée dans la glycolyse or l'activité glycolytique augmente dans les cellules en sénescence répliquative.

Parmi les gènes jouant un rôle dans le cycle cellulaire, la cycline G peut jouer un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire par son action permettant une boucle de rétro-action positive de p53. CROC1A, par son action sur c-fos et c-fos lui-même pourraient jouer un rôle dans l'augmentation du niveau d'expression MMPs qui dégradent la MEC.

Une autre voie de transduction du signal potentiellement impliquée dans notre modèle de SIPS a également été mise en évidence lors de l'étude avec le damier SeneChips. Il s'agit de la voie dépendant de R-ras. En effet, la protéine R-ras a déjà été démontrée comme pouvant enclencher une sénescence prématurée (Serrano et al., 1997). Une étude a récemment montré que la voie amenant à cette apparition de la sénescence passerait par les kinases MEK-1 et MEK-2 qui phosphoryleraient à leur tour la protéine p38 MAPK qui serait responsable de l'induction, par un mécanisme encore inconnu, des inhibiteurs du cycle cellulaire p21^{WAF-1} et p16^{INK-4a} (Wang et al., 2002). Dès lors, il serait intéressant d'étudier l'expression protéique de ces différents partenaires de cette voie de transduction du signal dans notre modèle. Un lien intéressant entre cette voie et la voie du TGF- β 1 pourrait être analysé car ces deux voies partagent un partenaire commun : la p38 MAPK.

Au terme de ce travail, nous avons peaufiné la validation d'un modèle de SIPS induite par les UVB, nous avons ouvert des pistes explicatives quant aux mécanismes d'apparition de caractères phénotypiques observés dans la SIPS et avons participé à la validation du damier à ADN à basse densité SeneChips.

BIBLIOGRAPHIE

PARTIE VI : BIBLIOGRAPHIE

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M. and Francz, P.I. (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5112-5116.
- Bohr, V.A., Stevnsner, T. and de Souza-Pinto, N.C. (2002) Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, **286**, 127-134.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H. and Toussaint, O. (2000) EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *Embo J*, **19**, 1929-1934.
- Bryan, T.M. and Cech, T.R. (1999) Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 318-324.
- Campisi, J. (1999) Replicative senescence and immortalization. In Stein, G.S., Baserga, A., Giordano, A. and Denhardt, D.T. (eds.), *The molecular basis of cell cycle and growth control*. Wiley-Liss, New York, pp. 348-373.
- Chainiaux, F., Magalhaes, J.P., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002a) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1331-1339.
- Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002b) Exposure of human skin diploid fibroblasts to repeated subcytotoxic doses of ultraviolet-B induces the overexpression of transforming growth factor-beta1 mRNA. *Ann N Y Acad Sci*, **973**, 44-48.
- Chen, M.M., Lam, A., Abraham, J.A., Schreiner, G.F. and Joly, A.H. (2000) CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, **32**, 1805-1819.
- Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M.S. and Bowden, G.T. (2001) Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes. *Oncogene*, **20**, 3921-3926.
- Choi, A.M., Olsen, D.R., Cook, K.G., Deamond, S.F., Uitto, J. and Bruce, S.A. (1992) Differential extracellular matrix gene expression by fibroblasts during their proliferative life span in vitro and at senescence. *J Cell Physiol*, **151**, 147-155.
- Cristofalo, V.J., Volker, C., Francis, M.K. and Tresini, M. (1998a) Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts. *Critical reviews in euKaryotic gene expression*, **8**, 43-80.
- de Longueville, F., Surry, D., Mereses-Lorente, G., Bertholet, V., Talbot, V., Evrard, S., Chandelier, N., Pike, A., Worboys, P., Rasson, J.P., Le Bourdelles, B. and Remacle, J. (2002) Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol*, **64**, 137-149.
- de Magalhaes, J.P., Chainiaux, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Stress-induced premature senescence in BJ and hTERT-BJ1 human foreskin fibroblasts. *FEBS Lett*, **523**, 157-162.
- Dierick, J.F., Eliaers, F., Remacle, J., Raes, M., Fey, S.J., Larsen, P.M. and Toussaint, O. (2002a) Stress-induced premature senescence and replicative senescence are different phenotypes, proteomic evidence. *Biochem Pharmacol*, **64**, 1011-1017.
- Dierick, J.F., Kalume, D.E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P. and Toussaint, O. (2002b) Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS Lett*, **531**, 499-504.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. and et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363-9367.
- Dumont, P., Balbeur, L., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000a) Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1alpha and TNF-alpha: senescence associated beta-galactosidase activity and morphotype transition. *J Anat*, **197 Pt 4**, 529-537.
- Dumont, P., Burton, M., Chen, Q.M., Gonos, E.S., Fripiat, C., Mazarati, J.B., Eliaers, F., Remacle, J. and Toussaint, O. (2000b) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med*, **28**, 361-373.
- Dumont, P., Chainiaux, F., Eliaers, F., Petropoulou, C., Remacle, J., Koch-Brandt, C., Gonos, E.S. and Toussaint, O. (2002) Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 23-35.
- Dy, L.C., Pei, Y. and Travers, J.B. (1999) Augmentation of ultraviolet B radiation-induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem*, **274**, 26917-26921.
- Fripiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J. and Toussaint, O. (2001) Subcytotoxic H2O2 stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *J Biol Chem*, **276**, 2531-2537.
- Fripiat, C., Dewelle, J., Remacle, J. and Toussaint, O. (2002) Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic Biol Med*, **33**, 1334-1346.
- Fuchs, J. and Packer, L. (1991) Photooxidative Stress in the Skin. In *Oxidative Stress : Oxidants and Antioxidants.*, pp. 559-583.
- Gonos, E.S., Derventzi, A., Kveiborg, M., Agiostratidou, G., Kassem, M., Clark, B.F., Jat, P.S. and Rattan, S.I. (1998) Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Exp Cell Res*, **240**, 66-74.
- Goyns, M.H. (2002) Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech Ageing Dev*, **123**, 791-799.
- Grigoriev, V.G., Moerman, E.J. and Goldstein, S. (1995) Overexpression of insulin-like growth factor binding protein-3 by senescent human fibroblasts: attenuation of the mitogenic response to IGF-I. *Exp Cell Res*, **219**, 315-321.
- Gujuluva, C.N., Baek, J.H., Shin, K.H., Cherrick, H.M. and Park, N.H. (1994) Effect of UV-irradiation on cell cycle, viability and the expression of p53, gadd153 and gadd45 genes in normal and HPV-immortalized human oral keratinocytes. *Oncogene*, **9**, 1819-1827.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*, **25**, 585-621.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M. and Landry, J. (1998) SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol*, **143**, 1361-1373.
- Itahana, K., Dimri, G. and Campisi, J. (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*, **268**, 2784-2791.
- Karp, G. (1998) *Biologie Cellulaire et Moléculaire*. De Boeck Université.

- Krtolica, A. and Campisi, J. (2002) Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1401-1414.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y. and Erusalimsky, J.D. (2000) Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*, **113** (Pt 20), 3613-3622.
- Leblanc, V. and May, P. (2002) Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *MEDECINE/SCIENCE*, **18**, 577-584.
- Liu, J.P. (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *Faseb J*, **13**, 2091-2104.
- Lowry, O., Rosebrought, N., Farr, A. and Randall, R. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Meissner, C., Mohamed, S.A., von Wurmb, N. and Oehmichen, M. (2001) [The mitochondrial genome and aging]. *Z Gerontol Geriatr*, **34**, 447-451.
- Okamoto, K., Li, H., Jensen, M.R., Zhang, T., Taya, Y., Thorgeirsson, S.S. and Prives, C. (2002) Cyclin G recruits PP2A to dephosphorylate Mdm2. *Mol Cell*, **9**, 761-771.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Rhodes, D., Fairall, L., Simonsson, T., Court, R. and Chapman, L. (2002) Telomere architecture. *EMBO Rep*, **3**, 1139-1145.
- Rittie, L. and Fisher, G.J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*, **1**, 705-720.
- Salmon, M. (2002) La PCR en temps réel. *LE TECHNOSCOPE de Biofutur*, **219**, 1-8.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
- Seshadri, T. and Campisi, J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*, **247**, 205-209.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D. and Funk, W.D. (1999) Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol*, **9**, 939-945.
- Toussaint, O., Dumont, P., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Magalhaes, J.P., Zdanov, S. and Chainiaux, F. (2002) Stress-Induced Premature Senescence or Stress-Induced Senescence-Like Phenotype : One *In Vivo* Reality, Two Possible Definitions? *The Scientific World*, **2**, 230-247.
- Toussaint, O., Fuchs, S.Y., Ronai, Z.A., Isoyama, S., Yuko, N., Petronilli, V., Bernardi, P., Gonos, E.S., Dumont, P. and Remacle, J. (1998) Reciprocal relationships between the resistance to stresses and cellular aging. *Ann N Y Acad Sci*, **851**, 450-465.
- Toussaint, O., Houbion, A. and Remacle, J. (1992) Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mech. Ageing Dev.*, **65**, 65-83.
- Toussaint, O., Medrano, E.E. and von Zglinicki, T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*, **35**, 927-945.
- Tyrrell, R.M. (1995) Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem Soc Symp*, **61**, 47-53.
- Vidal, C., Geny, B., Melle, J., Jandrot-Perrus, M. and Fontenay-Roupie, M. (2002) Cdc42/Rac1-dependent activation of the p21-activated kinase (PAK) regulates human platelet lamellipodia spreading: implication of the cortical-actin binding protein cortactin. *Blood*, **100**, 4462-4469.

- von Zglinicki, T. (2001) Telomeres and replicative senescence : is it only de length that counts? *Cancer Letters*, **168**, 111-116.
- Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S. and Sun, P. (2002) Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol*, **22**, 3389-3403.

ANNEXES

LISTE DES GENES PRESENTS SUR LA SENECHIPS

Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
ADAM1	A disintegrin and metalloproteinase domain1	Matrice extracellulaire	XM_090479
ADPRT	polysynthetase	Réparation ADN	J03473
ANX1	Annexin1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000700
AOP2	Anti-oxidant-protein2	Système de défense	NM_004905
APOB	ApolipoproteinB		NM_000384
APOE	ApolipoproteinE	Matrice extracellulaire	M12529
APOJ	ApolipoproteinJ	Système de défense	J02908
AREG	Amphiregulin		NM_001657
ATM	Ataxia telangiectasia mutated	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U26455
BAT1	Nuclear-RNA-helicase	Réparation ADN	Z37166
BAX	BCL2-associated X protein	Apoptose (+)	NM_004324
BCL2	B-cell lymphoma2	Apoptose (-)	NM_000633
BCLX	BCLX	Apoptose (-)	NM_001191
BMP2	Bone morphogenetic protein2	Apoptose	NM_001200
BRCA2	Breast cancer2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000059
CANX	calnexin	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001746
CASP7	caspase7	Apoptose (+)	NM_001227
CASP8	Caspase8	Apoptose (+)	X98172
CCNA1	cyclinA1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003914
CCNB1	cyclinB1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_031966
CCND1	cyclinD1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_053056
CCND2	cyclinD2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001759
CCND3	cyclinD3	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001760
CCNE1	CyclinE	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001238
CCNF	CyclinF	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001761
CCNG	CyclinG	Apoptose	U53328
CCNH	cyclinH	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001239
CDC42	Cell division cycle42	Morphologie	NM_001791
CDK2	Cyclin dependent kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001798
CDK4	Cyclin dependent kinase4	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U79269
CENPA	centromere-protein-A	Organisation chromosomique	U14518
CENPF	mitosin	Organisation chromosomique	U30872
C-FOS	c-fos	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005252
CKB	creatin-kinase-brain	Métabolisme énergétique	M16364
COL15A1	collagenXV-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_001855
COL1A1	Collagen1-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_000088
COL3A1	collagenIII-alpha1	Matrice extracellulaire	NM_000090
COL6A2	collagenVI-alpha2	Matrice extracellulaire	NM_001849
COX1	Prostaglandin endoperoxidase synthase1	Inflammation	NM_000962
COX2	Prostaglandin endoperoxidase synthase2	Inflammation	NM_000963
CROC1A	Ubiquitin conjugating enzyme E2 variant1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003349
CST6	cystatin-M	Matrice extracellulaire	U62800
CTGF	Connective tissue growth factor	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U14750
CTSD	cathepsinD	Matrice extracellulaire	NM_001904
CTSH	cathepsinH	Matrice extracellulaire	NM_004390
CTSS	cathepsinS	Matrice extracellulaire	M90696
CTSZ	cathepsinZ	Matrice extracellulaire	AF136273
CYT2A	Keratin2	Différentiation (Kératinocyte)	M99063
DHFR	Dihydrofolate reductase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000791
DPT	dermatopontin	Matrice extracellulaire	XM_001897
DSG1	desmoglein1	Différentiation (Kératinocyte)	AF097935
E2F1	E2F transcription factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005225
E2F5	E2F transcription factor5	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U31556
EAR1	Nuclear receptor subfamily1, group D, member 1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_021724
EF1A	Eukaryotic translation elongation factor-alpha1	Organisation chromosomique	AY043301
EGR1	Early growth response1	Système de défense	NM_001964
EGR2	Early growth response2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000399
EGR3	Early growth response3	Système de défense	NM_004430
EIF-4A	Eukaryotic translation initiation factor 4A		NM_001416
ELN	elastin	Matrice extracellulaire	NM_000501
EPC1	Enhancer of polycomb1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF286904
ETFB	electron-transfert-flavoprotein-beta	Métabolisme énergétique	NM_001985

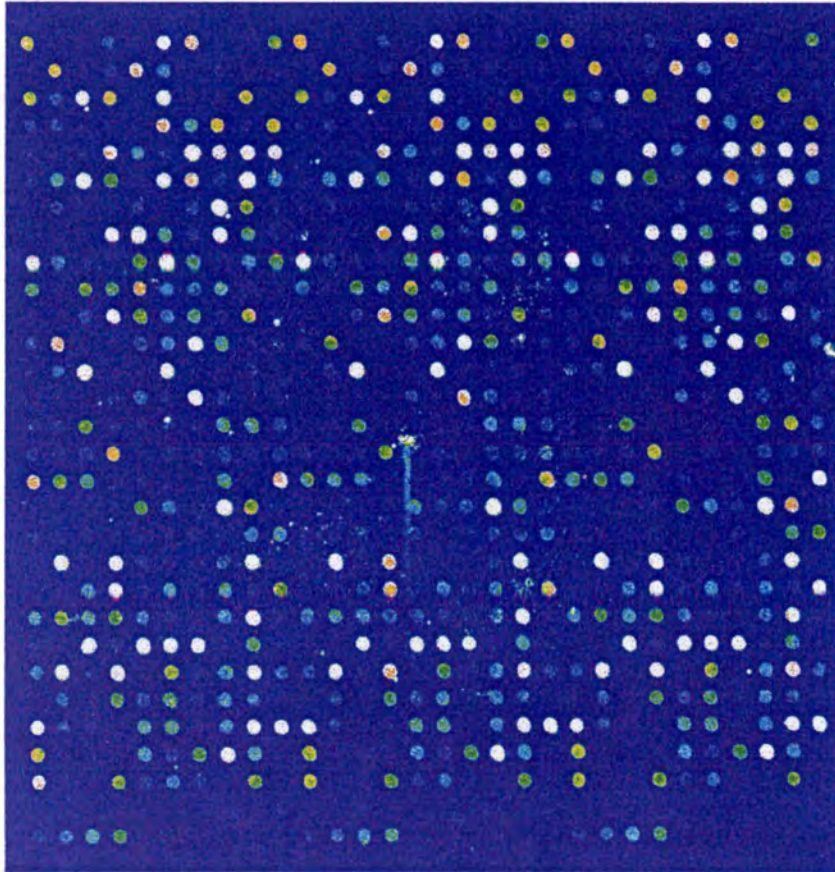
Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005243
FE65	Fe65	Apoptose	L77864
FES	Feline sarcoma oncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X52192
FLG	filaggrin	Différentiation (Kératinocyte)	M60502
FMOD	fibromodulin	Matrice extracellulaire	NM_002023
FN1	fibronectin	Matrice extracellulaire	X02761
G6PD	glucose-6-phosphate-dehydrogenase	Métabolisme énergétique	NM_000402
GAA	glucosidase-II-precursor	Métabolisme énergétique	NM_000152
GADD153	DNA damage inducible transcript3	Réparation ADN	S40706
GLB1	Beta1-galactosidase	Différentiation (Kératinocyte)	M34423
GMCSF	Colony stimulating factor2		M11220
GPX	glutathione peroxidase	Système de défense	M21304
GRB2	Growth factor receptor-bound protein2	Système de défense	NM_002086
GSTP1	Glutathione S-transferase pi		NM_000852
GSTT1	Glutathione S-transferase theta1		NM_000853
H2B/S	histone2b member B/S consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_080593
H3FF	histone3 member F consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003533
H4FM	histone4 member M consensus	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003495
HBEGF	Heparin binding epidermal growth factor transcript		M60278
HLF	Hepatic leukemia factor	Système de défense	M95585
HMOX	heme-oxygenase	Système de défense	NM_002133
HSP27	Heat shock 27kD protein1	Système de défense	AB020027
HSP40	Heat shock 40kD protein1	Système de défense	D49547
HSP70	Heat shock 70kD protein1	Système de défense	AB023420
HSP70B	Heat shock 70kD protein6	Système de défense	NM_002155
HSP90-alpha	Heat shock 90kD protein1 alpha	Système de défense	X15183
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule1	Matrice extracellulaire	J03132
ID1	Inhibitor of DNA binding1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X77956
ID2	Inhibitor of DNA binding2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	M97796
IFNG	Interferon gamma	Cytokine	X13274
IGF1	Insulin like growth factor1	Facteur de croissance	X57025
IGF1R	Insulin like growth factor1 receptor	Facteur de croissance	NM_000875
IGFBP2	Insulin growth factor binding protein2	Facteur de croissance	M35410
IGFBP3	Insulin growth factor binding protein3	Facteur de croissance	X64875
IGFBP5	Insulin growth factor binding protein5	Facteur de croissance	M65062
IL10	Interleukin 10	Cytokine	NM_000572
IL11	Interleukin 11	Cytokine	NM_000641
IL11RA	Interleukin 11-receptor-alpha	Cytokine	U32324
IL12	Interleukin 12	Cytokine	M65291
IL15	Interleukin 15	Cytokine	NM_000585
IL1A	Interleukin1 alpha	Cytokine	NM000575
IL1B	Interleukin1 beta	Cytokine	M15330
IL2	Interleukin 2	Cytokine	U25676
IL3	Interleukin 3	Cytokine	M20137
IL4	Interleukin 4	Cytokine	NM_000589
IL6	Interleukin 6	Cytokine	NM000600
IL8	Interleukin 8	Cytokine	NM_000584
INT6	Translation initiation factor3 subunit6	Morphologie	NM_001568
IVL	involucrin	Différentiation (Kératinocyte)	M13903
JNK1	Mitogen activated protein kinase8	Système de défense	L26318
JNK2	Mitogen activated protein kinase9	Système de défense	U09759
JNKK1	Mitogen activated protein kinase kinase 4	Système de défense	NM_003010
JUND	Jun D proto-oncogene	Système de défense	NM_005354
Ki-67	Ki-67		NM_002417
KNSL5	mitotic-kinesin-like-protein1	Organisation chromosomique	NM_004856
KNSL6	mitotic-centromere-associated-kinesin	Organisation chromosomique	NM_006845
KRT1	keratin1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_006121
KRT10	keratin10	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000421
KRT14	keratin14	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000526
KRT16	keratin16	Différentiation (Kératinocyte)	AF061812
KRT17	keratin17	Différentiation (Kératinocyte)	X62571
KRT19	Keratin19	Différentiation (Kératinocyte)	NM_002276

Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
KRT6A	Keratin6	Différentiation (Kératinocyte)	NM_005554
L6	Transmembrane4 superfamily member1		M90657
MAP17	Membrane associated protein17		U21049
MAX	MAX protein	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002382
MCM2	Mitotin	Réparation ADN	D21063
MDM2	MDM2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002392
MEK1	Mitogen activated protein kinase kinase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	L11284
MEK2	Mitogen activated protein kinase kinase2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_030662
MMP1	matrix metalloproteinase 1	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002421
MMP10	matrix metalloproteinase 10	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002425
MMP11	matrix metalloproteinase 11	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_005940
MMP12	matrix metalloproteinase 12	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002426
MMP13	matrix metalloproteinase 13	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002427
MMP14	matrix metalloproteinase 14	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_004995
MMP15	matrix metalloproteinase 15	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002428
MMP2	matrix metalloproteinase 2	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_004530
MMP3	matrix metalloproteinase 3	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002422
MMP7	matrix metalloproteinase 7	Matrice extracellulaire (Dégradation)	NM_002423
MP1	Metalloprotease1	Matrice extracellulaire (Dégradation)	AF061243
MSRA	methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	Réparation protéines	AF183420
MT2A	metallothionein 2A	Système de défense	V00594
MVK	mevalonate-kinase		M88468
MYBL2	b-myb	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X13293
MYC	c-myc	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_012333
NCK1	NCK adaptor protein1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_006153
NF1	neurofibromin1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000267
NGFR	nerve growth factor receptor	Système de défense	M14764
NRG1	neuregulin		M94165
ODC	Ornithine decarboxylase1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002539
OPG	osteoprotegerin	Matrice extracellulaire	U94332
OPN	osteopontin	Migration	NM_000582
Oste	osteonectin	Matrice extracellulaire	NM_003118
p16	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	Cycle cellulaire (-)	L27211
p21	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	Cycle cellulaire (-)	U03106
p27	Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	Cycle cellulaire (-)	NM_004064
p35	Cyclin dependent kinase5 regulatory subunit1	Cycle cellulaire (-)	NM_003885
p53	Tumor protein p53	Cycle cellulaire (-)	AF307851
p57	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	Cycle cellulaire (-)	NM_000076
PAI1	plasminogen activator inhibitor type1	Matrice extracellulaire	M14083
PAI2	plasminogen activator inhibitor type2/Urokinase inhibitor	Matrice extracellulaire	J02685
PAK	P21 activated kinase1	Morphologie	NM_002576
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM002592
PKM2	pyruvate-kinase-muscle	Métabolisme énergétique	M26252
PLAU	urokinase		NM_002658
PLAUR	urokinase-receptor		NM_002659
PLK	Polo-like kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U01038
POLA2	Polymerase alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002689
PRSS11	Protease serine11		NM_002775
PSMA2	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 2	Dégradation protéique	NM_002787
PSMA3	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	Dégradation protéique	NM_002788
PSMC6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6	Dégradation protéique	NM_002806
PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1	Dégradation protéique	NM_002807
PSMD11	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11	Dégradation protéique	AB003102
PSMD12	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 12	Dégradation protéique	NM_002816
PSOR1	psoriasin		M86757
RAF1	c-raf-1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X03484
RANTES	Small inducible cytokine A5		NM_002985
RB1	Retinoblastome1	Cycle cellulaire (-)	NM_000321
RET	ret protooncogene	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000323
ROR1	R AR related orphan receptorA	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U04897
RPL3	60S-ribosomal-proteinL3		NM_000967
RPS10	ribosomal-protein S10		NM_001014

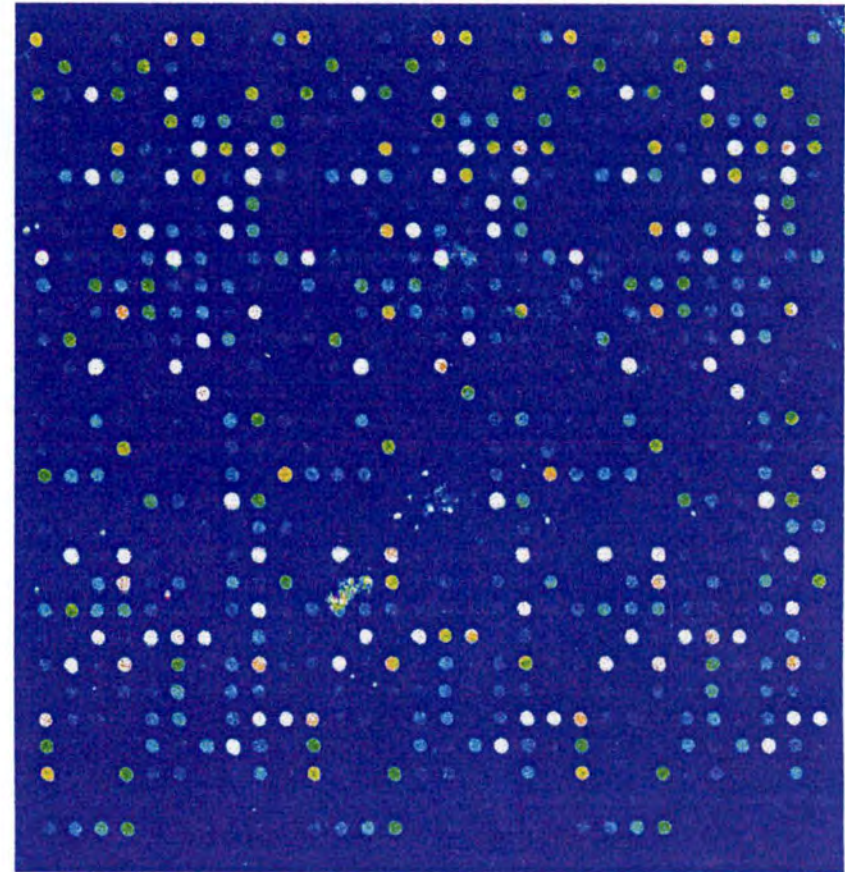
Gene symbol	Gene	General function	Gene bank
RRAS	R-ras	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_006270
RRM1	ribonucleotide-reductase M1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001033
S100A10	Calpactin1	Différentiation (Kératinocyte)	M81457
S100A11	Calgizzarin	Différentiation (Kératinocyte)	D38583
S100A8	calprotectin	Inflammation	NM_002964
SHC	SHC transforming protein1	Apoptose	U73377
SLK	Ste-20-related serine/threonine kinase	Apoptose	NM_014720
SLP2	Stomatin like protein2	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF282596
SM22	transgelin	Developpement muscle	M95787
SMAD1	Mother against decapentalplegic homol1	Morphologie	U59423
SNCG	synuclein	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003087
SOD2	Superoxide dismutase2	Système de défense	NM_000636
SPRR1B	cornifin	Différentiation (Kératinocyte)	NM_003125
SRI	sorcin	Système de défense	NM_003130
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5A	Cycle cellulaire/ duplication ADN	L41142
TBXA2R	Thromboxane-A2-receptor	Cycle cellulaire/ duplication ADN	D38081
TERC	telomerase-RNA	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U86046
TERT	telomerase-reverse transcriptase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	AF018167
TFAP2A	Transcription factor AP2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	M36711
TFAP2B	Transcription factor AP2-beta	Cycle cellulaire/ duplication ADN	X95694
TFAP2C	Transcription factor AP2-gamma	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003222
TGFA	TGF-alpha	Facteur de croissance	NM_003236
TGFB1	TGF-beta1	Facteur de croissance	NM_000660
TGFBR2	TGF-beta-R2	Facteur de croissance	D50683
TGM1	transglutaminase1	Différentiation (Kératinocyte)	NM_000359
TH	Tyrosine-hydroxylase		NM_000360
THBS1	Thrombospondin	Matrice extracellulaire	X14787
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase1	Matrice extracellulaire	NM_003254
TIMP2	Tissue inhibitor of metalloproteinase2	Matrice extracellulaire	NM_003255
TK1	thymidine-kinase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_003258
TNFA	tumor necrosis factor alpha	Apoptose/inflammation	NM_000594
TNFB	tumor necrosis factor beta	Apoptose/inflammation	NM_000595
TNFRSF1A	TNF-alpha-RI	Apoptose/inflammation	X55313
TNFRSF1B	TNF-alpha-RII	Apoptose/inflammation	NM_001066
TOP2A	topoisomerase2-alpha	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001067
TPA	Plasminogen activator tissue	Matrice extracellulaire	NM_000930
TRF1	Telomeric repeat binding factor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	U40705
TYMS	thymidylate-synthetase	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_001071
UBE2C	Ubiquitin conjugating enzyme E2C/ubiquitin carrier protein	Dégradation protéique	NM_007019
VEGFC	Vascular endothelial growth factor C	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_005429
VEGFR1	Vascular endothelial growth factor receptor1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_002019
Housekeeping gene			
ACTB	Beta-Actin	Morphologie	NM_001101
Aldo	Aldolase A,	Glycolyse	NM_000034
cyc	Cyclophilin 33A	Synthèse protéique	AF042385
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase	Glycolyse	NM002046
HK1	Hexokinase 1	Enzyme glycolytique	M75126
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Cycle cellulaire/ duplication ADN	NM_000194
MDH	Malate dehydrogenase 1	Enzyme cycle Krebs	NM_005917
PLA2	Phospholipase A2	inflammation	M86400
S9	Ribosomal Proteine S9	Synthèse protéique	NM_001013
SDS	Serine Dehydratase	House Keeping gene	NM_006843
TFR	Transferrin receptor	House Keeping gene	NM_003234
Tubu	Alpha-tubulin	Morphologie	NM006082
23kd	23KDa Highly basic protein	Synthèse protéique	X56932

Senechips

Stress UVB



Contrôle



Lame senechips du 11.04.03

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.

Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

20 JUIN 2003